

Untersuchungen zum Verpackungsprotein gp3

des Salmonella-Phagen P22:

Molekularbiologische und genetische Studien

sowie Reinigung des Genprodukts

Sigrid Schießl

Disbui. München

1988



**Untersuchungen zum Verpackungsprotein gp3
des Salmonella-Phagen P22:
Molekularbiologische und genetische Studien
sowie Reinigung des Genprodukts**

**Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**vorgelegt von
Sigrid Schießl
aus Nabburg
München 1987**

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Schmieger
2. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Fiedler

Tag der mündlichen Prüfung: 2.2.1988

Die vorliegende Arbeit wurde von Mai 1983 bis Mai 1987 am Institut für Genetik der Universität München unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Schmieger durchgeführt.

Ich bedanke mich in erster Linie bei Herrn Prof. Dr. Schmieger für sein Interesse am Fortgang dieser Arbeit, seine Anregungen und seine ständige Diskussionsbereitschaft.

Beim proteinchemischen Teil dieser Arbeit gilt mein Dank besonders Herrn Dr. Robin Harkness für seine Kollegialität, seine wertvollen Tips und seine Zeit für die Interpretation meiner Resultate.

Ebenso gilt mein Dank Herrn Dr. Schach von Pharmacia Freiburg für die bereitwillige Diskussion meiner Ergebnisse.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Fiedler und seiner Arbeitsgruppe, insbesondere Herrn Klaus Zimmer, für die gute Kooperativität und die bereitwillige Zuverfügungstellung einiger Geräte.

Weiterhin gilt mein Dank Frau Prof. Dr. Schrempf für ihre Anregungen zu meiner Arbeit.

Außerdem bedanke ich mich bei Herrn Dr. Bernhard Petri und Frau Anita Meierl für ihre Hilfe bei der Sequenzierung, sowie bei meinen ehemaligen Arbeitskollegen Frau Ursula Hamker und Frau Dr. Johanna Teifl und bei allen anderen Mitarbeitern des Labors und der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Lubitz für die Hilfsbereitschaft und unsere gute Zusammenarbeit.

Besonders danke ich meinen Eltern, die mir diese Ausbildung ermöglicht haben.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Zusammenfassung.....	1
A. Einleitung.....	4
B. Material und Methoden.....	14
I. Bakterienstämme.....	14
II. Medien.....	18
III. Puffer und Lösungen.....	20
IV. Chemikalien.....	25
V. Enzyme.....	26
VI. Methoden.....	27
1. Übernachtkulturen.....	27
2. Phagenspezifische Methoden.....	27
2.1 Transduktion von chromosomalen Markern.....	27
2.2 Transduktion von Plasmiden.....	27
2.3 Isolierung von Phagen-DNS.....	27
2.3.1 Herstellung eines Phagenlysats im Flüssigmedium.....	27
2.3.2 Konzentrieren eines Phagenlysats über eine Cellex E-Säule.....	28
2.3.3 Konzentrieren und Reinigen von Phagen über einen CsCl-Stufengradienten.....	28
2.3.4 Isolierung der Phagen-DNS durch Phenolextraktion.....	28
3. Isolierung von Plasmid-DNS (Großansatz).....	28
4. DNS-Präparation (Minipräparation).....	29
5. Spaltung von DNS mit Restriktionsendonukleasen.....	30
6. Präparation von Restriktionsfragmenten.....	30
7. Auffüllung überstehender 5'-Enden mit dem Klenowfragment der DNS-Polymerase I.....	31
8. Dephosphorylierung von DNS mit alkalischer Phosphatase.....	31
9. Verdauung von DNS mit Bal 31.....	31
10. Ligation.....	32
11. Transformation.....	32
12. Agarose-Gelelektrophorese.....	32
13. Sequenzierung nach Sanger.....	33
13.1 Isolierung des Phagenvektors mp19.....	33
13.2 Transfektion.....	33
13.3 Präparation der Templates.....	33
13.4 Annealing.....	34

	Seite
13.5	Sequenzierungsreaktion.....34
13.6	Gießen eines Sequenzgels.....34
14.	Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität.....35
15.	In vitro-Verpackung von L-DNS.....36
15.1	Herstellung von Zellextrakten.....36
15.2	In vitro-Verpackung.....36
16.	Isolierung von Minizellen.....36
16.1	Markierung der Minizellen.....38
16.2	Bestimmung der eingebauten Radioaktivität.....38
17.	Proteinbestimmung nach Bradford.....38
18.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....39
18.1	Färben von Proteingelen.....39
18.1.2	Coomassiefärbung.....39
18.1.3	Silberfärbung.....39
18.2	Trocknung und Autoradiographie von Proteingelen.....40
19.	Präparation von Säulenmaterialien und Packung der Säule.....40
19.1	Gelfiltration mit Sephadex G50 und G75.....41
19.2	Affinitätschromatographie mit Heparin Sepharose CL 6B.....41
19.3	Affinitätschromatographie mit DNS-Cellulose.....42
20.	Isolierung des Proteins gp3.....42
20.1	Rohextrakterstellung.....42
20.2	Streptomycinsulfatfällung.....43
20.3	Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung.....43
20.4	Affinitätschromatographie mit Heparin Sepharose CL 6B.....44
20.5	Affinitätschromatographie mit DNS-Cellulose.....44
20.6	Gelfiltration mit Sephadex G50 und G75.....45
21.	Quantifizierung von Proteinen durch densitometrische Messung.....45
22.	Verwendete Abkürzungen.....46
C.	Ergebnisse.....48
a)	Steigerung der Expression des Genprodukts 3 von P22 und den P22 Mutanten HT12/4 und NT1/1.....48
1.	Problemstellung.....48
2.	Allgemeine Kriterien für eine Expressionssteigerung...49
3.	Konstruktion eines geeigneten Vektors.....55
3.1	Klonierung des Gens 3 in das Plasmid pBR322.....55
3.2	Fusionierung des Gens 3 mit dem lacZ-Gen55
3.3	Vorschalten eines lac-Promotorfragments zur Kontrolle der Expression des Gen 3-lacZ-Hybridgens.....56

3.4	Entfernung des lacZ-Genanteils und Rekonstitution des Gens 3.....	59
b)	Untersuchung der biologischen Funktion des Genprodukts 3 von P22 und den P22 Mutanten N1/1 und HT12/4..	61
1.	Allgemeine Beschreibung der Mutanten.....	61
1.1	NT-Mutanten.....	61
1.2	HT-Mutanten.....	62
2.	Untersuchung der Transduktion verschiedener rekombinierter Plasmide.....	63
3.	Untersuchung der Transduktion verschiedener chromosomaler Marker.....	68
3.1	Transduktion chromosomaler Marker durch die Phagen P22H5, NT1/1 und HT12/4.....	68
3.2	Transduktion chromosomaler Marker bei einer Expression des Genprodukts 3 von rekombinierten Plasmiden.....	68
c)	Identifizierung des Proteins gp3 mit dem Minizellsystem von <u>E. coli</u>	72
d)	Isolierung und Charakterisierung des Proteins gp3.....	78
1.	Einführung in die Problemstellung.....	78
2.	Zellaufschluß bei <u>Salmonella typhimurium</u>	80
3.	Entfernung der DNS aus dem Zellextrakt.....	82
4.	Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung.....	88
5.	Gelfiltration mit Sephadex G50 und G75.....	88
6.	Affinitätschromatographie mit Heparin Sepharose CL 6B.....	92
7.	Einfluß von Tween auf die Aggregate des Proteins gp3.....	94
8.	Untersuchung der Stabilität des Proteins gp3 bei den einzelnen Reinigungsstufen.....	98
9.	Erzielte Anreicherung.....	103
D.	Diskussion.....	108
E.	Literaturverzeichnis.....	115

Zusammenfassung

Der Bakteriophage P22 ist ein temperenter Phage, dessen Wirtsspektrum, soweit man weiß, auf Salmonella -Arten beschränkt ist.

An der Verpackung der DNS sind zwei späte Genprodukte, gp2 und gp3, beteiligt. Nach dem Modell von Streisinger et al. (1967) ist das Substrat für die Verpackung ein DNS-Concatemer. Das Genprodukt 3 erkennt auf diesem Concatemer eine bestimmte Region innerhalb seines eigenen Gens. Der Erkennungsbereich wird pac-site genannt. Das Genprodukt 2 führt wahrscheinlich in einem bestimmten Abstand von der Erkennungsregion den pac-Schnitt durch.

Es war Ziel dieser Arbeit, das Protein gp3 näher zu untersuchen. Dabei wurden folgende Ergebnisse erzielt:

1. Ich klonierte das Gen 3 der P22 Mutanten HT12/4 und NT1/1 in das Plasmid pBR322. Das Gen 3 des Wildtyps war bereits vorher in unserer Arbeitsgruppe kloniert worden. Auf Grund dieser Klonierung wurde das Protein gp3 unter der Kontrolle des Tetracyclinpromoters von pBR322 exprimiert. Um die Expression des Genprodukts 3 zu steigern, versuchte ich ein geeignetes Vektorsystem zu konstruieren. Ich führte meine Konstruktion fast analog der Publikation von Guarente et al. (1980) durch. Dabei verwendete ich das Vektorplasmid pMC1403 für eine Fusionierung des Gens 3 mit dem lacZ-Gen. Nach der Fusionierung des N-terminalen Teils von Gen 3 mit dem lacZ-Gen verkürzte ich den Abstand zum Startcodon von Gen 3 mit Bal31 und setzte ein 850 Bp lac-Promoterfragment vor das Gen 3-lacZ-Hybridgen. Die β -Galaktosidaseaktivität des gp3- β -Galaktosidase-Hybridproteins konnte durch den lac-Promoter, im Vergleich zur Expression unter dem Tetracyclinpromoter, um den Faktor 104 gesteigert werden. Anschließend entfernte ich den lacZ-Anteil und rekonstituierte das Gen 3. Bei den neukonstruierten Plasmiden wird das Protein gp3 konstitutiv vom lac-Promoter exprimiert.

2. Eine Untersuchung des Genprodukts 3 von P22 und den Phagenmutanten HT12/4 bzw. NT1/1 und eine Aussage über die biologische Funktion dieses Proteins war durch zahlreiche Transduktionsexperimente möglich.

- Aus einem Vergleich der T/P-Werte, die man bei der Transduktion von Hybridplasmiden mit kloniertem Gen 3 von P22 und den P22 Mutanten HT12/4 und NT1/1 bzw. dem Plasmid pBR322 durch den Phagen erfam3 erhält, kann man ersehen, daß von den rekombinierten Plasmiden das Genprodukt 3 exprimiert wird.
- Die erhöhten T/P-Werte bei der Transduktion der neukonstruierten Plasmide pGM1208, pGM1209, pGM1210 durch den Phagen erfam3 weisen auf eine erhöhte Expression des Proteins gp3 unter der Kontrolle des lac-Promoters hin.
- Durch Transduktionsexperimente mit den Gen 3-lacZ-Fusionsklonen kann man zeigen, daß bei der Mutante HT12/4 nicht die pac-Stelle verändert ist, sondern das Genprodukt 3.
- Vergleicht man die T/P-Werte, die man bei der Transduktion verschiedener chromosomaler Marker durch den Phagen NT1/1 erhält, mit den T/P-Werten bei der Expression des Genprodukts 3 vom klonierten HindIII/XhoI-Fragment der Mutante NT1/1, so findet man Abweichungen. Die Mutante NT1/1 zeichnet sich durch eine generell niedrige Transduktion chromosomaler Marker aus. Wenn das Genprodukt 3 der Mutante NT1/1 vom rekombinierten Plasmid pGM1201 gebildet wird, kann man eine ähnliche Transduktion chromosomaler Marker wie beim Wildtyp erkennen (pGM1000). Dadurch kann man bestätigen, daß der eigentliche Mutationsort dieser Mutante außerhalb des Gens 3 liegt.

3. Mit Hilfe des Minizellsystems von E. coli konnte ein Protein identifiziert werden, das nicht vektorspezifisch ist und ein Molekulargewicht aufweist, wie es vom Protein gp3 zu erwarten ist, nämlich 17,8 KD. Eine Steigerung der Expression dieses Proteins mit dem konstruierten Vektorsystem konnte ebenfalls gezeigt werden.

4. Bei der Reinigung des Proteins gp3 orientierte ich mich nicht an der Vorschrift von Poteete u. Botstein (1979), sondern versuchte, geeignetere Reinigungsbedingungen zu finden. Auf Grund der Empfindlichkeit des Genprodukts 3 gegenüber

Proteasen war es unbedingt notwendig, jeden Reinigungsschritt in Gegenwart des Proteaseinhibitors PMSF durchzuführen. Die Entfernung der DNS aus dem Zellextrakt erwies sich als erforderlich, um eine spezifische Bindung an Heparin Sepharose CL 6B zu erhalten. Für eine Ausfällung der DNS eignete sich Streptomycinsulfat in Gegenwart von 0,6 M NaCl am besten. Das Protein gp3 kann durch Affinitätschromatographie mit Heparin Sepharose CL 6B und anschließender Gelfiltration mit Sephadex G75 gereinigt werden. Durch die Affinitätschromatographie wird eine Anreicherung von 1416 erzielt. Die Abreicherung auf 565 nach der Gelfiltration ist auf den starken Aktivitätsabfall des Proteins gp3 zurückzuführen. Die Aktivität des Genprodukts 3 kann bis zur Chromatographie mit Heparin durch 20 mM $MgCl_2$ stabilisiert werden. Der Aktivitätsabfall nach der Gelfiltration kann weder durch BSA, Gelatine, Magnesium noch durch andere Ionen verhindert werden. Statt der Gelfiltration kann auch eine Affinitätschromatographie mit DNS-Cellulose als zweiter Chromatographieschritt angeschlossen werden. Das Genprodukt 3 ist nach diesem Reinigungsschritt stabil und aktiv.

Durch Gelfiltration mit Sephadex G50 und G75 konnte gezeigt werden, daß das Protein gp3 bevorzugt in einer Aggregatform vorliegt. Diese oligomere Struktur kann entweder auf einer Aggregation des Genprodukts 3 mit sich selbst (Homooligomer) oder mit anderen Zellkomponenten (Heterooligomer) beruhen. Mit 0,01% bis 0,02% Tween 80 konnte die Aggregation des Proteins gp3 aufgehoben werden.

A. Einleitung

Viren sind Organismen, die keinen eigenen Stoffwechsel besitzen und deshalb zur Vermehrung auf einen Wirt angewiesen sind. Bei Bakteriophagen ist dieser Wirt ein Bakterium. Man unterscheidet generell zwischen virulenten und temperenten Bakteriophagen. Zu den virulenten Phagen gehören z.B. die geradzahligen T Phagen von E. coli oder der Phage SP01 von Bacillus subtilis. Bei ihnen läuft nach der Infektion der Bakterienzelle in jedem Fall ein lytischer Zyklus ab.

Bei temperenten Phagen, z.B. P22 von Salmonella typhimurium und P1 sowie Lambda von E. coli, kann nach der Infektion entweder ein lytischer Zyklus ablaufen oder eine Lysogenisierung der Bakterienzelle eintreten. Der Salmonella-Phage P22 wurde von Zinder und Lederberg (1952) entdeckt. Sie konnten zeigen, daß er die Fähigkeit zur allgemeinen Transduktion von Salmonella-Genen besitzt. Seitdem dient er den Genetikern sowohl als Werkzeug als auch als Forschungsobjekt.

Das Virus besteht aus einem ikosaedrischen Capsid mit einem Durchmesser von 60 nm und einem kurzen Schwanz (Susskind u. Botstein 1978). Jedes Phagenpartikel enthält ein Molekül linearer, doppelsträngiger DNS, die eine Länge von 15µm und ein Molekulargewicht von 27 bis 28 x 10⁶ D hat (Tye et al. 1974a, Susskind et al. 1978). Wenn man eine Population von P22 Molekülen betrachtet, so kann man erkennen, daß sie zirkulär permutiert sind und eine terminale Redundanz von 2-4% besitzen (Rhoades et al. 1968, Tye et al. 1974a). Bisher konnten 32 Gene identifiziert und teilweise in ihrer Funktion charakterisiert werden (Abb.1).

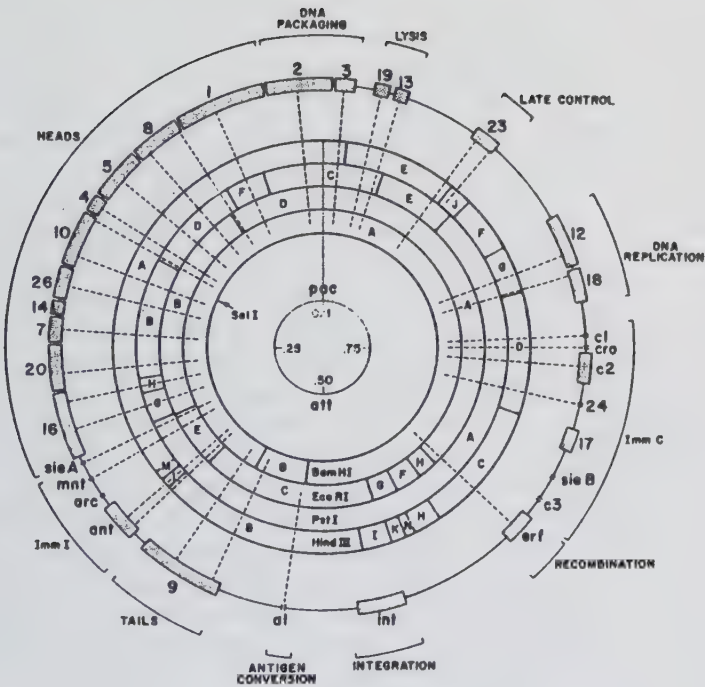


Abb.1: Genetische und physische Karte des P22 Genoms (Rutilla u. Jackson 1981)

Der äußere Kreis zeigt die Anordnung der Gene. Die inneren Kreise zeigen die Spaltstellen der Enzyme BamHI, EcoRI, PstI und HindIII relativ zur Anordnung der Gene.



Streisinger und Mitarbeiter (1967) haben für den Bakteriophagen T4 ein Headful-Modell für die Verpackung der DNS vorge-schlagen. Dieses Headful-Modell kann auch zum Verständnis der Verpackung phageneigener bzw. bakterieller DNS bei P22 dienen. Nach der Infektion der Bakterienzelle kommt es zur Bildung von DNS-Concatemeren, die bis zu 10 Phagengenomlängen enthalten können. Die Bildung dieser Concatemere kann durch das rolling-circle-Modell von Gilbert und Dressler (1968) erklärt werden. Nach dem Headful-Modell wird von dem DNS-Concatemer soviel in die leere Phagenhülle verpackt, wie diese zu fassen vermag. Auf diese Weise werden 102-104% des Phagengenoms verpackt. Eine DNS mit 2-4% terminaler Redundanz bezeichnet man als "Headful". Durch die DNS-Verpackung nach dem Headful-mechanismus wird eine Population von DNS-Molekülen mit unterschiedlicher Anfangs- und Endsequenz gebildet. Diese Moleküle bezeichnet man als zirkulär permutiert. Mit Hilfe des Streisinger-Modells kann man die Entstehung zirkulär permutierter und terminal redundanter DNS-Moleküle verstehen. Dieses Modell erklärt jedoch nicht, ob die Verpackung der DNS sequentiell von einer Position aus erfolgt oder durch zufälliges Herausschneiden eines Headfuls aus dem Concatemer. Bei einer sequentiellen Verpackung von einer festgelegten Position aus würde man erwarten, daß die DNS-Enden der einzelnen Headfuls auf Grund der terminalen Repetition in einem bestimmten Bereich des Genoms verteilt sind. Eine zufällige Verpackung sollte man an der Streuung der DNS-Enden über einen größeren Bereich des Genoms erkennen.

Tye et al. (1974a,b) führten partielle Denaturierungs-Experimente mit DNS von P22 und einigen Deletionsmutanten durch. Durch diese Versuche konnten sie beweisen, daß die DNS-Verpackung an einer Stelle startet und von dort aus nach dem Headfulmechanismus sequentiell in einer Richtung erfolgt. Die DNS-Enden der einzelnen Headfuls sind beim Wildtyp in einem Bereich von nur 20% des Genoms verteilt.

Beim Phagen P22 sind zwei späte Genprodukte, gp2 und gp3, an der Verpackung der DNS beteiligt. Daß diese Proteine eine Mitwirkung an der Verpackung haben, kann man mit Hilfe von Ambermutanten in diesen Genen zeigen. Ambermutanten in beiden Genen synthetisieren concatemere DNS, die jedoch nicht verpackt

werden kann, obwohl die benötigten Köpfe (proheads) vorhanden sind. Stattdessen beobachtet man eine Akkumulation der Proheads (Susskind u. Botstein 1978). Aus Transduktionsexperimenten mit verschiedenen rekombinierten Plasmiden, die Subfragmente des kodierenden Bereichs des Gens 3 enthalten, weiß man, daß das Protein gp3 einen bestimmten Bereich innerhalb seines eigenen Gens erkennt (Schmidt u. Schmieger 1984). Diese Erkennungsregion wird pac-site genannt und konnte bisher als Basensequenz nicht identifiziert werden. Die Transduktionen wurden prinzipiell unter $\text{rec}^- \text{erf}^-$ -Bedingungen durchgeführt. Auf Grund der Defekte in den Rekombinationssystemen des Bakterienstamms (recA) und des Phagens (erf) wird jede Rekombination zwischen Überinfizierendem Phagen und Insert des Hybridplasmids verhindert. Dies ist eine wesentliche Voraussetzung, um festzustellen, ob das vom Phagen gebildete Genprodukt 3 eine Sequenz auf dem klonierten Subfragment als pac-site erkennt und deshalb das Plasmid transduzieren kann. Das Genprodukt 2 führt vermutlich in einem bestimmten Abstand von der Erkennungsregion die pac-Schnitte durch. Die Nukleasefunktion von gp2 konnte allerdings noch nicht nachgewiesen werden. Die pac-Schnitte sind an 6 verschiedenen Positionen in einem Bereich von 120 Bp innerhalb des Gens 3 verteilt (Backhaus 1985, Casjens u. Huang 1982). Da die pac-Schnitte in einer bestimmten Entfernung von der pac-site erfolgen ist die Bezeichnung pac-Schnitt irreführend. Sie werden deshalb auch als Endschnitte bezeichnet. Von dem DNS-Ende, das durch den pac-Schnitt freigesetzt wird, wird dann eine sequentielle Verpackung der DNS nach dem Headfulmechanismus begonnen.

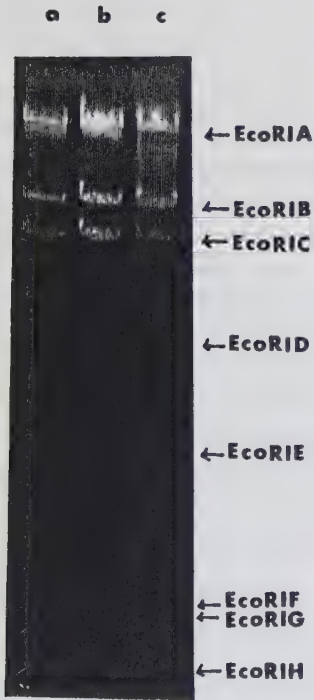
Daß das Protein gp3 eine Erkennungsfunktion hat, kann mit Hilfe von HT-Mutanten gezeigt werden. HT-Mutanten sind Mutanten im Gen 3, die sich durch eine, im Vergleich zum Wildtyp, erhöhte Transduktion chromosomaler Marker auszeichnen. Diese Mutanten wurden von Schmieger (1972) isoliert. Obwohl alle HT-Mutanten im Gen 3 kartieren, zeichnen sie sich durch eine unterschiedliche Affinität zur pac-site aus.

Man kann 2 Klassen von HT-Mutanten unterscheiden. Die erste Klasse startet die Verpackung der Phagen-DNS, wie der Wildtyp, an der pac-site. Dazu gehören die Mutanten HT13/4, HT104/2

usw. (Jackson et al. 1982). Die zweite Klasse erkennt die Wildtyp-pac-site nicht, sondern startet die DNS-Verpackung an anderen Stellen auf dem Phagen genom. Zu dieser Klasse von Mutanten gehört die Mutante HT12/4, die ich in der vorliegenden Arbeit näher charakterisiert habe, sowie die Mutante HT109/2. Daß die Mutante HT12/4 die DNS-Verpackung nicht an der Wildtyp-pac-site startet, kann man zeigen, indem man die EcoRI Restriktionsmuster von P22 und der P22 Mutante NT1/1 mit dem von HT12/4 vergleicht (Abb.2). Die Mutante NT1/1 zeichnet sich durch eine generell geringe Transduktion chromosomaler Marker aus (Raj et al. 1974). Diese Mutante hat nach unbestätigten Angaben von Jackson eine höhere Spezifität für die pac-site als der Wildtyp und soll bevorzugt erste Headfuls verpacken. Neben der Mutante HT12/4 wurde diese Mutante in meiner Arbeit näher untersucht.

Bei einem Vergleich der EcoRI Restriktionsmuster von P22H5 und NT1/1 mit HT12/4 kann man erkennen, daß bei der Phagenmutante HT12/4 das EcoRID Fragment fehlt (4000 Bp). Dieses Fragment wird nur bei der Verpackung erster Headfuls gebildet. Es entsteht durch den pac-Schnitt und den Schnitt mit EcoRI (Abb.3). Das Fehlen des EcoRID Fragments bei der Mutante HT12/4 dient als Beweis für das im Vergleich zum Wildtyp geänderte Verpackungsverhalten.

Abb.2: EcoRI Spaltung der DNAs von P22H5, NT1/1 und HT12/4. Die EcoRI Restriktionsfragmente sind mit EcoRIA-EcoRIH bezeichnet.



a: P22H5 EcoRI
b: NT1/1 EcoRI
c: HT12/4 EcoRI

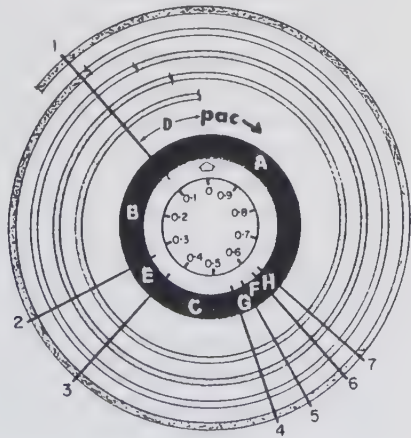


Abb.3: Zirkuläre EcoRI-Restriktionskarte von P22 (Jackson et al. 1982). Die DNS-Verpackung beginnt bei pac (⊕) und verläuft sequentiell nach dem Headful-mechanismus (s.Pfeilrichtung).

Vermutlich hat das Protein gp3 außer der Erkennungsfunktion für pac noch andere Funktionen. Während die pac-site in vivo unbedingt für den Start der DNS-Verpackung erforderlich ist (Kufer et al. 1982, Schmieger 1984), konnten Behnisch und Schmieger (1985) zeigen, daß die DNS-Verpackung in vitro vollkommen unabhängig von der pac-site ist. Bei ihren Experimenten synthetisierten sie Concatemere der Plasmide pGM1000 bzw. pBR322. Nur das Plasmid pGM1000 enthält ein pac-Signal. Nach einer in vitro-Verpackung dieser künstlich hergestellten Plasmid-Concatemere untersuchten sie die Anzahl der gebildeten plasmidtransduzierenden Phagenpartikel. Bei beiden angebotenen Concatemeren konnten sie die gleiche Anzahl an entstandenen transduzierenden Phagenpartikeln ermitteln. Diese Resultate beweisen, daß die pac-site für eine DNS-Verpackung in vitro nicht erforderlich ist. Da das Genprodukt 3 trotzdem für eine DNS-Verpackung in vitro notwendig ist, zeigen sie außerdem, daß dieses Protein neben der Erkennungsfunktion noch andere wichtige Funktionen bei der Bildung von reifen Phagenpartikeln haben muß. E. Fischer aus unserer Arbeitsgruppe konnte zeigen, daß auch die Enden des synthetisierten Plasmid-Concatemers einen Einfluß auf die Verpackung in vitro haben. Concatemere mit glatten Enden werden besser verpackt als solche mit überstehenden Enden. Backhaus (1985) untersuchte die Enden der DNS-Moleküle, die durch den pac-Schnitt in vivo erzeugt wurden. Auf Grund der schlechten Markierbarkeit mit γ -ATP konnte er schließen, daß durch den pac-Schnitt in vivo glatte Enden gebildet werden, die dann den Startpunkt der Verpackung darstellen. Interessanterweise findet man hier Übereinstimmungen zwischen in vivo und in vitro-Verpackung der DNS.

Casjens u. King (1974) gelang es erstmals mit Hilfe von Ambermutanten, die Proteine gp2 und gp3 im Maxizellsystem von Salmonella typhimurium zu identifizieren. Youderian u. Susskind (1980) konnten diese Daten bestätigen. Das Molekulargewicht der Proteine wurde mit 67 KD (gp2) und 17 KD (gp3) festgestellt. Aus den Proteindaten beider Gruppen war ersichtlich, daß das Protein gp3 vom Phagen in sehr geringer Menge exprimiert wird. Poteete und Botstein (1979) gelang es, das Genprodukt 2 aus einem Salmonella -Stamm zu reinigen, der mit einem Phagen

infiziert war, der eine Ambermutation im Gen 3 hatte. Da dieser Phage kein funktionsfähiges Genprodukt 3 bilden kann, war eine Isolierung des Genprodukts 2 unabhängig vom Genprodukt 3 möglich. Sie versuchten ebenso, beide Proteine aus einem Salmonella -Stamm zu reinigen, der mit einem Phagen infiziert war, von dem die Proteine gp2 und gp3 exprimiert wurden. Als sie die Proteine der Aktivitätsfraktion des letzten Chromatographieschritts, einer Hydroxylapatitsäule, auf einem Proteingel auftrennten, konnten sie neben dem Genprodukt 2 ein Protein identifizieren, das dem Molekulargewicht nach dem Protein gp3 entsprechen konnte. Bei ihrer Reinigung konnten sie jedoch nur die Aktivität des Genprodukts 2 durch in vitro-Verpackung nachweisen. Auf Grund des fehlenden Aktivitätsnachweises für das Protein gp3 konnten sie erst durch Bestimmung der Sedimentationskonstanten auf einen Komplex aus den Proteinen gp2 und gp3 schließen. Das Protein gp2, das aus einem 3⁻-Zellextrakt gereinigt wurde, hatte eine Svedbergkonstante von 4,9 S. Ein 3⁻-Zellextrakt enthält kein funktionsfähiges Genprodukt 3. Das aus einem 3⁺-Zellextrakt gereinigte Genprodukt 2 sedimentierte, vermutlich durch die Gegenwart des Proteins gp3, schneller. Der ermittelte Svedbergwert war 10,6 S.

Für P22 wurde ein in vitro-Verpackungssystem von Strobel u. Schmieger (1979) erarbeitet. Bei der in vitro DNS-Verpackung wird ein Zellextrakt, den man durch Infektion eines Salmonella -Stamms mit einem Phagen, der eine Ambermutation im Gen 3 bzw. Gen 2 trägt, herstellt, durch Zugabe eines Zell- bzw. Säulenextrakts, der das jeweilige Protein (gp3 bzw. gp2) enthält, komplementiert. E. Koch aus unserer Arbeitsgruppe gelang es erstmals, die Aktivität des Proteins gp3 durch in vitro-Verpackung nachzuweisen. Bei ihrem Versuch, die Reinigung der Proteine gp3 und gp2 nach der Vorschrift von Poteete zu wiederholen, konnte sie nach dem ersten Reinigungsschritt, einer Ultrazentrifugation, eine geringe Aktivität des Proteins gp3 nachweisen. Nach der 1. Säule (DEAE-Sephacel-Chromatographie) waren die Aktivitätswerte noch geringer. Sie konnte jedoch zeigen, daß das Protein gp3 nicht nur als Komplex mit dem Protein gp2, sondern zum größeren Teil auch in freier Form vorkommen kann (Schmieger u. Koch 1987, im Druck). Nach

einem 2. Chromatographieschritt (Phosphocellulose-Säule) konnte sie keine Aktivität des Genprodukts 3 mehr nachweisen.

Da eine Reinigung des Genprodukts 3 auf Grund der hohen Aktivitätsverluste nicht durchführbar war, konnte man bisher auch keine Angaben über das stöchiometrische Verhältnis des Komplexes aus den Proteinen gp2 und gp3 machen.

Über das Zusammenwirken beider Proteine und den Mechanismus der DNS-Verpackung kann man nur eine Modellvorstellung entwickeln.

Nach dieser Vorstellung ist das Substrat für eine DNS-Verpackung in vivo entweder lineare concatemere DNS, die durch einen rolling-circle-Mechanismus entsteht, oder zirkulär geschlossene concatemere DNS, die durch Rekombination gebildet wird. Das rolling-circle-Modell ist bei P22 bisher nicht nachgewiesen worden. Für die Bildung transduzierender Phagenpartikel stellt zirkulär geschlossene DNS (das Wirtschromosom) das Substrat dar. Das Genprodukt 3 erkennt, vermutlich als Komplex mit dem Genprodukt 2, eine Region innerhalb seines eigenen Gens (pac-site). Das Genprodukt 2 führt dann, vermutlich in einem Abstand zur Erkennungsregion, den pac-Schnitt durch. Durch den pac-Schnitt entsteht ein freies DNS-Ende. Neben der Erkennungsfunktion scheint eine weitere Funktion des Proteins gp3 darin zu bestehen, dieses freie DNS-Ende mit dem Prohead in Kontakt zu bringen. Der Prohead ist eine Vorläuferstruktur des reifen Phagenkopfs, an dessen Bildung 6 späte Phagenproteine beteiligt sind. Das Protein gp1 ist eines dieser Proteine. Ambergmutanten im Protein gp1 bilden zwar eine Proheadstruktur, sind aber nicht in der Lage, DNS zu verpacken (Botstein et al. 1973). Vermutlich scheint dieses Protein von Bedeutung zu sein für den Kontakt zwischen DNS und Prohead. Wie der Transport der DNS zum Kopf erfolgt, ist ungeklärt. Wenn etwas mehr als eine Genomlänge in den Kopf eingeschleust wurde, erfolgt ein unspezifischer Terminationsschnitt.

Wie aus dieser Modellvorstellung ersichtlich ist, gibt es bei der Verpackung der DNS zahlreiche bisher nicht geklärte Aspekte.

Ziel meiner Arbeit war es, das Protein gp3 unabhängig vom Genprodukt 2 näher zu untersuchen. Ich versuchte dabei nicht nur, das Protein gp3 des Wildtyps, sondern auch die Genprodukte 3 der P22 Mutanten NT1/1 und HT12/4 näher zu

charakterisieren. Da das Genprodukt 3 auf Grund der Maxizelldaten von Casjens u. King (1974) in geringer Menge gebildet wird, schien es mir notwendig, ein Vektorsystem zu konstruieren, um die Expression dieses Proteins zu steigern. Auf Grund der Proteindaten von E. Koch wußte ich, daß das Hauptproblem bei einer Wiederholung der Proteinreinigung die hohe Instabilität des Proteins gp3 ist. Ich versuchte daher, mich nicht an der Vorschrift von Poteete u. Botstein (1979) zu orientieren, sondern geeignetere Reinigungsbedingungen auszuarbeiten. Das eigentliche Endziel meiner Arbeit sollte darin bestehen, Bindungsstudien an verschiedenen pac-Substraten mit gereinigtem Protein gp3 des Wildtyps und der Mutanten NT1/1 und HT12/4 durchzuführen.

B. Material und Methoden

I. Bakterienstämme, Bakteriophagen, Plasmide

Bakterienstämme

Escherichia coli

Bezeichnung	Genotyp, Kurzbeschreibung	Herkunft
490A	r ⁻ m ⁻ , met, thi, leu, recA, lac, strA	Hobom
MC1061	araD139, Δ(ara, leu)7697, Δlac(IPOZY)X74, galU, galK, hsr ⁻ , hsm ⁺ , strA	Beckwith
P678-54	smR, thr, leu, lacY, thi, minA, minB, gal	H.J. Adler
JM101	supE, thi, Δ(lac-proAB)F'(traD36, proAB, lacI ^q , zAM15)	Messing

Salmonella typhimurium

Bezeichnung	Genotyp, Kurzbeschreibung	Herkunft
DB21	prototropher Wildtyp	Botstein
His(sie)	hisB22, (P22sie-1, ts12.1, ts2.1)	Levine
Su70	cys ^{am} , su ⁺	Labor
DB5575	cysA1348, his ^{am} C527, end-1	Schumann
CC4412recA	proC90, hsdR ⁻ _{Lt} , SA ⁺ , hsdm ⁺ _{Lt} , SA ⁺ _{Lt} , strR, recA1 Tn5	Labor
HS1022(P22)	leuA124, araB9, P22 lysogen	Sanderson
HS1140(P22)	ProA2(H1), P22 lysogen	Sanderson

Bakteriophagen

Bakteriophagen von Escherichia coli

Bezeichnung	Genotyp, Kurzbeschreibung	Herkunft
M13mp19	lacI', P, O, Z (α Peptid) Klonierungsvektor	Messing

Bakteriophagen von Salmonella typhimurium

Bezeichnung	Genotyp, Kurzbeschreibung	Herkunft
H5	P22 c2 ⁻ , Klarplaquemutante	Labor
HT12/4	P22 c2 ⁻ , N-methyl-N'-nitro-N-Nitroso-guanidin induzierte Mutante von H5 mit erhöhter Transduktionshäufigkeit	"
NT1/1	P22 c2 ⁻ , N-methyl-N'-nitro-N-Nitroso-guanidin induzierte Mutante von H5 mit verminderter Transduktionshäufigkeit	"
am2am13c2 ⁻	P22 2 ⁻ amH200 13 ⁻ amH101c2 ⁻	"
am3am13c2 ⁻	P22 3 ⁻ amN6 13 ⁻ amH101c2 ⁻	"
erfam3	P22 erf ⁻ 3 ⁻ amN6	"
erf3HT	P22 erf ⁻ 3amHT	d.Arbeit
L	L-Phage, Wildtyp	B.Stocker

Übersicht über die verwendeten Plasmide

Bezeichnung	Kurzbeschreibung	Kodiertes Protein	Kontrolle der Expression	Herkunft
pMC1403	ApR, lacZ ohne die ersten 7 Codons, lacY, lacA, Vektor			Casadaban
pGM1000	ApR, HindIII/XhoI-Fragment von H5 wurde in den HindIII/SalI-Bereich von pBR322 kloniert.	gp3	Tc Promoter	Labor
pGM1200	ApR, HindIII/XhoI-Fragment von HT12/4 wurde in den HindIII/XhoI-Bereich von pBR322 kloniert.	HTgp3	"	d. Arbeit
pGM1201	ApR, HindIII/XhoI-Fragment von NT1/1 wurde in den HindIII/XhoI-Bereich von pBR322 kloniert.	NTgp3	"	"
pGM1202	ApR, EcoRI/Sau3A-Fragment von pGM1000 wurde in den EcoRI/Sau3A-Bereich von pMC1403 kloniert.	gp3- β -Galaktosidase-Fusionsprotein	"	"
pGM1203	ApR, EcoRI/Sau3A-Fragment von pGM1200 wurde in den EcoRI/BamHI-Bereich von pMC1403 kloniert.	HTgp3- β -Galaktosidase-Fusionsprotein	"	"
pGM1204	ApR, EcoRI/Sau3A-Fragment von pGM1201 wurde in den EcoRI/BamHI-Bereich von pMC1403 kloniert.	NTgp3- β -Galaktosidase-Fusionsprotein	"	"

Bezeichnung	Kurzbeschreibung	Kodiertes Protein	Kontrolle der Expression	Herkunft
pGM1205	ApR, PstI/PvuII-lac-Promoter-fragment wurde vor das Gen 3-lacZ-Hybridgen von pGM1202 kloniert.	gp3-β-Galak-tosidase-Fusionsprotein	lac-Promoter	d.Arbeit
pGM1206	ApR, PstI/PvuII-lac-Promoter-fragment wurde vor das HTGen 3-lacZ-Hybridgen von pGM1203 kloniert.	HTgp3-β-Galak-tosidase-Fusionsprotein	"	"
pGM1207	ApR, PstI/PvuII-lac-Promoter-fragment wurde vor das NTGen 3-lacZ-Hybridgen von pGM1204 kloniert.	NTgp3-β-Galak-tosidase-Fusionsprotein	"	"
pGM1208	ApR, MstII/NdeI-Fragment von pGM1205 wurde in den MstII/NdeI-Bereich von pGM1000 kloniert.	gp3	"	"
pGM1209	ApR, PstI/MstII-Fragment von pGM1206 wurde in den PstI/MstII-Bereich von pGM1200 kloniert.	HTgp3	"	"
pGM1210	ApR, PstI/MstII-Fragment von pGM1207 wurde in den PstI/MstII-Bereich von pGM1201 kloniert.	NTgp3	"	"
pBR322	ApR, TcR, Vektor			Sutcliffe
PLG101	ApR, enthält ein PstI/PvuII-lac-Promoterfragment (lacP, 0, SD des lacZ-Gens).			Ptashne

II. Medien

LB-Medium

10,0 g Bacto Trypton
 5 0 g Yeast Extrakt
 5,0 g NaCl
 1,0 l H_2O deion.

LB Weichagar

LB-Medium + 0,7% Bacto-Agar

LB Platten

LB-Medium + 1,5% Bacto Agar

Bei Antibiotikaplatten werden jeweils 100 ug Ap bzw. 12,5 ug Tc zugegeben.

McConkey Platten

Fertigmedium (Difco Labs, Detroit)
 (50 g/l)

ENB-Medium

8,0 g Nutrient Broth
 5,0 g Bacto Pepton
 1,0 g Glucose
 1,5 g KH_2PO_4
 3,5 g Na_2HPO_4
 5,0 g NaCl
 5,0 mg Thiaminhydrochlorid
 1,0 l H_2O deion.

Citrat-Minimalmedium

8,0 g K_2HPO_4
 2,8 g $NaNH_4HPO_4$
 1,6 g Na-Citrat
 0,2 g Glucose
 160 mg $MgSO_4 \times 7H_2O$
 1,0 l H_2O deion.

Minimal-Medium A

10,5 g K_2HPO_4
 4,5 g KH_2PO_4
 1,0 g $(NH_4)_2SO_4$
 0,5 g NaCitrat $\times 2 H_2O$
 1,0 l H_2O deion.

M9-Minimalmedium

100 ml 10x M9-Salze

900 ml H_2O deion.

Nach dem Autoklavieren

Zugabe von:

20 ml 20%iger Glucose

1 ml 1M $MgSO_4$

und je nach Auxotrophie:

0,3 ml Methionin (10 mg/ml)

0,3 ml Threonin (10 mg/ml)

0,3 ml Leucin (10 mg/ml)

2 ml 10% Casaminoacids

10 x M9-Salze

150 g $Na_2HPO_4 \times 12H_2O$

30 g KH_2PO_4

5 g $NaCl$

10 g NH_4Cl

1,0 l H_2O deion.

M9-Platten

15 g Bacto-Agar

800 ml H_2O deion.

Nach dem Autoklavieren

Zugabe von:

100 ml 10 x M9-Salze

10 ml Glucose 20%

10 ml $MgSO_4$ 0,1M

Methionin Assay Medium

5,0 ml Methionin Assay Medium

(10,5% Difco Labs, Detroit)

15,0 ml Citrat-Minimalmedium

ohne Glucose

0,15 ml Glucose 20%

Alle Lösungen werden
getrennt autoklaviert.

III. Puffer und Lösungen

Minizellpräparation:

BSG-Puffer pH=7,8

8,5 g NaCl

0,3 g KH_2PO_4

0,7 g Na_2HPO_4

0,1 g Gelatine

1,0 l H_2O deion.

Probenpuffer nach Laemmli

0,0625 M Tris-HCl pH=6,8

2 % SDS

10 % Glycerin

5 % β -Mercaptoethanol

0,05 % Bromphenolblau

Sucrosegradient:

32 ml einer 20%igen Sucroslösung in BSG-Puffer werden in SW 27 Nitrocelluloseröhrchen bei -20°C eingefroren und langsam bei 4°C aufgetaut. Dabei stellt sich der Gradient ein (5-20%).

DNS-Präparation, modifiziert nach Birnboim und Doly (1979):

Lösung A

1,25 ml 1 M Tris-HCl pH=8,0

1,7 ml 0,3 M EDTA

2,5 ml 2 % Glucose

44,5 ml H_2O deion.

Lösung B

2,5 ml 1 M NaOH

0,5 ml 20 % SDS

7,5 ml H_2O deion.

Lösung C

40,8 g Na-Acetat werden mit Essigsäure auf pH=4,8 eingestellt und mit H_2O deion. auf 100 ml aufgefüllt.

Test auf β -Galaktosidaseaktivität (Miller 1972):

Z-Puffer pH=7,0

16,1 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot x7\text{H}_2\text{O}$

5,5 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot x2\text{H}_2\text{O}$

0,75 g KCl

0,246 g $\text{MgSO}_4 \cdot x7\text{H}_2\text{O}$

2,7 ml β -Mercaptoethanol

1,0 l H_2O deion.

Natriumphosphat-Puffer pH=7,0

61,0 ml Na_2HPO_4

39,0 ml NaH_2PO_4

Der Z-Puffer muß nicht autoklaviert werden.

Verdünnungsflüssigkeit

10 g NaCl
1 g Bacto-Trypton
1 l H₂O deion.

Proteintest nach Bradford (1976):

Proteinreagenz:

10 mg Commassie Brilliant Blue G-250
5 ml 95 % Ethanol
10 ml 85 % Phosphorsäure
100 ml H₂O deion.

Sequenzierung nach Sanger (1977, 1980):

Siliconisierlösung für die Deckplatte: 2 % Dichlordimethylsilan in
Chloroform

Silanisierlösung für die Unterplatte: 150 ul 10 % Essigsäure
5 ul Silan
5 ml Ethanol

10 x TBE pH=8,8-9	10 x Annealing-Puffer pH=7,5
162 g Tris	100 mM Tris-HCl pH=7,5
27,5 g Borsäure	100 mM MgCl ₂
9,5 g EDTA x 2H ₂ O	500 mM NaCl

Herstellung eines Sequenzgels (6% Acrylamid):

47,5 g Harnstoff

10 ml 10 x TBE

12,5 ml 40 % (19:1 Acrylamid /Bisacrylamid)

Nach Hinzufügen von etwas H₂O wird die Lösung im warmen

Wasserbad gerührt, filtriert und das Volumen mit H₂O deion. auf

100 ml aufgefüllt. Für Gele von 0,4 cm Dicke und 40 cm Länge reichen

60-70 ml 6% Acrylamidlösung. Für die Polymerisation des Gels werden

0,6 bzw. 0,7 ml 10% Ammoniumperoxodisulfat und 17 bzw. 20 ul TEMED
zugegeben.

Präparation von Templates: 20 % PEG 6000

2,5 M NaCl

Transfektion: 20 mg/ml IPTG in H₂O bei - 20°C eingefroren
20 mg/ml X-Gal in Dimethylformamid gelöst,
bei -20°C aufbewahrt.

TE-Puffer pH=7,5

10 mM Tris-HCl pH=7,5

0,1 mM EDTA

17 Basenpaar-Primer: 2,5 ng/ul H₂O quarzdest.

Stammlösungen: 10 mM ddNTP in 100 mM TE

20 mM dNTP in 100 mM TE

Verdünnungen : 0,5 mM dNTP in 10 mM TE

0,8 mM ddTTP in 10 mM TE

0,1 mM ddCTP in 10 mM TE

0,2 mM ddGTP in 10 mM TE

0,13 mM ddATP in 10 mM TE

Chaselösung: 0,5 mM dNTP

Nukleotidmix für ³²P:

	T	C	G	A
0,5 mM dTTP	10	200	200	200
0,5 mM dCTP	200	10	200	200
0,5 mM dGTP	200	200	10	200
0,8 mM ddTTP	410	-	-	-
0,1 mM ddCTP	-	410	-	-
0,2 mM ddGTP	-	-	410	-
0,13 mM ddATP	-	-	-	164
TE	-	-	-	246

Die Zahlenangaben beziehen sich auf ul. Die jeweiligen Ansätze
werden zusammenpipetiert und bei - 20°C eingefroren.

Nukleotidmix für ³⁵S:

		T	C	G	A
0,5	mM dTTP	25	500	500	500
0,5	mM dCTP	500	25	500	500
0,5	mM dGTP	500	500	25	500
10	mM ddTTP	50	-	-	-
10	mM ddCTP	-	8	-	-
10	mM ddGTP	-	-	16	-
10	mM ddATP	-	-	-	1
TE		1000	1000	1000	500

Deionisieren von Formamid: 5 g Amberlite MB-1 werden mit 100 ml Formamid 30 min. bei Raumtemperatur gerührt und anschließend filtriert.

Farbmarker für Sequenzgele: 10 ml deionisiertes Formamid
 3 mg Bromphenolblau
 3 mg Xylencyanol
 7,5 mg EDTA
 bei - 20 °C eingefroren

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese:

Acrylamidlösungen:

30 % Acrylamid

1 % N, N-Methylenbisacrylamid

Obergel (5%)

1,67 ml 30 % Acrylamid
 1,3 ml 1 % Bisacrylamid
 1,25 ml 1 M Tris-HCl pH=6,8
 50 ul 20 % SDS
 3,4 ml H₂O deion.
 1 ml Glycerin
 50 ul 10 % APS
 5 ul TEMED

Trenngel (17,5 %)

17,5 ml 30 % Acrylamid
 2,6 ml 1 % Bisacrylamid
 7,5 ml 1,5 M Tris-HCl pH=8,7
 0,15 ml 20 % SDS
 2,5 ml H₂O deion.
 100 ul 10 % APS
 10 ul TEMED

Trenngel (20 %)

20 ml 30 % Acrylamid
 2 ml 1 % Bisacrylamid
 7,5 ml 1,5 M Tris-HCl pH=8,7
 0,15 ml 20 % SDS
 0,25 ml H₂O
 100 µl 10 % APS
 10 µl TEMED

Gelpuffer pH=8,3 (5 x konz.)

144 g Glycin
 30 g Tris
 5 g SDS
 1 l H₂O deion.

Färbelösung für Polyacrylamidgele

0,05 % Coomassie Brilliant Blue R 250
 25 % Isopropanol
 10 % Essigsäure

Entfärbelösung: 10 % Essigsäure

Elektrophoresepuffer für Agarose-gele pH=8,3

40 mM Tris-Acetat
 20 mM Na-Acetat
 2 mM EDTA
 0,4 µg/ml Ethidiumbromid

Farbmarker für Agarosegele

0,05 % Bromphenolblau
 0,05 % Xylencyanol
 10 mM EDTA
 40 % Ficoll
 3 M Harnstoff

Dialysepuffer

1 M Tris-HCl pH=7,5
 0,1 M EDTA
 1,0 l H₂O deion.

Puffer für die in vitro-Verpackung

25 mM Tris-HCl pH=7,4
 5 mM MnCl₂
 6 mM Spermidin in 25 mM Tris pH=7,4
 3 mM β-Mercaptoethanol
 bei - 20 °C eingefroren
 1,5 mM ATP in 25 mM Tris-HCl pH=7,4
 gelöst, wird erst zum Verpackungs-
 extrakt zugegeben.

Equilibriertes Phenol

Phenol (Merck) aufgeschmolzen
 100 mM Tris-HCl pH=8,0
 0,1 % 8-Hydroxylchinolin

Szintillationsflüssigkeit

5 g PPO (2,5-Diphyloxazol)
50 mg POPOP(1,4-bis-2(Phenylloxalyl)-
benzol
1 l Toluol

Säulenpuffer für die Affinitätschromato-
graphie mit Heparin Sepharose CL 6B

25 mM Tris-HCl pH=7,5
20 mM MgCl₂
0,01 % Tween 80
0,1 mM PMSF
3 mM β -Mercaptoethanol

Säulenpuffer für die Gel-
filtration mit Sephadex G50

100 mM Tris-HCl pH=7,5
0,1 mM PMSF
3 mM β -Mercaptoethanol

Der Puffer für die Affinitätschromato-
graphie mit DNS-Cellulose hat die-
selbe Zusammensetzung wie der Puffer
für Heparin Sepharose CL 6B.

Säulenpuffer für die Gelfil-
tration mit Sephadex G75 Fine

100 mM Tris-HCl pH=7,5
20 mM MgCl₂
0,1 mM PMSF
3 mM β -Mercaptoethanol

Der Puffer für die Gelfiltration mit Sephadex G75 Superfine enthält,
zusätzlich zur Zusammensetzung des Puffers für Sephadex G75 Fine,
0,02% Tween 80.

IV. Chemikalien

Säulenmaterial: Sephadex G50 Fine, Sephadex G75 Fine und Superfine,
Heparin Sepharose CL 6B, DNS-Cellulose wurden von Pharmacia Freiburg
bezogen.

Silan GF-31: Wacker Chemie, München

Bio-Rad Silverstain: Bio-Rad, Richmond

Markerproteine für Proteingele: Serva Heidelberg

Radiochemikalien:

¹⁴C-Markerproteine: Carboanhydrase (30 KD), Trypsininhibitor
(21,5 KD), Cytochrom C (12,5 KD), Aprotinin (6,5 KD), Insulin (3,4
KD und ³²P-dATP (600 Ci/mM): Amersham Buchler, Braunschweig.

Alpha-³²P-dATP (600 Ci/mM): Amersham Buchler, Braunschweig

Alpha-³⁵S-dATP (650 Ci/mM): Amersham Buchler, Braunschweig

³⁵S-Methionin (1023 Ci/mM): New England Nuclear Corp., Boston

Alle übrigen verwendeten Chemikalien und Reagenzien sind handelsübliche Produkte der Firmen Merck, Serva, Fluka, Wacker Chemie und Böhringer.

V. Enzyme

Klenow-Fragment der DNS-Polymerase I, T4 Ligase: Böhringer Mannheim
Alle verwendeten Restriktionendonukleasen wurden von den Firmen Böhringer, Renner, Biolabs und BRL bezogen.

VI. Methoden

1. Übernachtkulturen

5 ml des jeweiligen Mediums werden mit 0,05 ml Bakterienkultur angeimpft und über Nacht bei 37°C im Rollbebrüter inkubiert. Die Bakterienkultur hat dann eine Dichte von ca. 2×10^9 Zellen/ml.

2. Phagenspezifische Methoden

2.1 Transduktion von chromosomalen Markern

Die Übernachtkultur eines geeigneten Empfängers wird mit dem Phagenlysat 10:1 gemischt und 10 min. zur Adsorption der Phagen bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Verschiedene Verdünnungsstufen werden dann auf Minimalplatten ausplattiert. Nach einer Inkubation über 2 Tage bei 37°C kann das T/P-Verhältnis ermittelt werden. Der T/P-Wert ist das Verhältnis von Transduktanten zu infektiösen Phagenpartikeln.

2.2 Transduktion von Plasmiden

Ein Empfängerstamm wird 10:1 mit dem Phagenlysat gemischt und 10 min. bei 37°C inkubiert. Anschließend werden von geeigneten Verdünnungsstufen jeweils 0,1 ml zu 2 ml Weichagar pipettiert. Das Gemisch wird auf Membranfilter (Schleicher & Schüll BA85) gegossen, die auf die Oberfläche von LB-Platten gelegt wurden. Nach 2 Stunden Inkubation bei 37°C zur Expression der Resistenzproteine wird der Filter auf eine LB-Platte, die ein selektives Antibiotikum enthält, transferiert und über Nacht bei 37°C bebrütet.

2.3 Isolierung von Phagen-DNS

2.3.1 Herstellung eines Phagenlysats im Flüssigmedium

Eine geeignete Übernachtkultur wird 1:100 in LB-Medium verdünnt und bis zu einer Zelldichte von 2×10^8 Zellen bei 37°C inkubiert. Nach Erreichen dieser Zelldichte wird die Kultur mit Phagen infiziert ($moi=5$). Nach 1,5 h Inkubation bei 34°C wird Chloroform zugesetzt, um noch nicht lysierte Zellen zu öffnen. Nach Zentrifugation der Zellfragmente (10 min. bei 5000 rpm) wird der Überstand filtriert und der Phagentiter bestimmt.

2.3.2 Konzentrieren eines Phagenlysats Über eine Cellex E-Säule

Eine Cellex E-Säule wird mit 1 M NaOH equilibriert und mit entionisiertem Wasser bis zur Neutralität gewaschen. Das Phagenlysat wird auf den Anionenaustauscher aufgetragen. Die Phagen können anschließend mit 0,3 M NaCl eluiert werden.

2.3.3 Konzentrieren und Reinigen von Phagen Über einen CsCl-Stufengradienten

In Röhrchen aus Polyallomer werden 6 ml CsCl-Lösung einer Dichte von $1,6 \text{ g/cm}^3$ vorsichtig mit 10 ml CsCl-Lösung von $1,4 \text{ g/cm}^3$ überschichtet. Das konzentrierte Phagenlysat wird vorsichtig darüber geschichtet. Die Zentrifugation erfolgt im SW 27-Rotor bei 5°C und 23000 rpm für 90 Minuten. Die Bakteriophagen besitzen eine Dichte von $1,5 \text{ g/cm}^3$ und bandieren daher zwischen beiden Lösungen. Sie werden mit einer Kanüle abgezogen und das CsCl wird durch Dialyse entfernt.

2.3.4 Isolierung der Phagen-DNS durch Phenolextraktion

Die Über einen CsCl Gradienten gereinigten Phagen werden 1:1 mit Phenol gemischt, das equilibriert ist mit 100 mM Tris-HCl pH=8,0. Das Gemisch wird 20 min. langsam in einem Schraubverschlußröhrchen gerollt und zur Phasentrennung in der Minifuge zentrifugiert (10 min. bei 5000 rpm). Die wässrige Phase wird abpipettiert und die Phenolbehandlung noch 1-2 mal wiederholt. Zur Entfernung des Phenols wird die DNS-haltige Phase unter mehrmaligem Pufferwechsel Über Nacht dialysiert. Die wässrige Phase wird in Gegenwart von 0,3 M Ammoniumacetat mit 2,5 Volumen Ethanol (96%) versetzt und die DNS 30 min. bei -70°C gefällt. Die ausgefällte DNS wird mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in quartzdestilliertem Wasser aufgenommen.

3. Isolierung von Plasmid-DNS (Großansatz)

500 ml LB-Medium werden mit 2 ml Übernachtskultur des jeweiligen Stammes beimpft und in Gegenwart von selektivem Antibiotikum unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Wenn die Kultur eine optische Dichte von 0,8 bei 580 nm erreicht hat, wird Chloramphenicol (200 $\mu\text{g/ml}$) zur Amplifikation der Plasmide zugegeben und die Kultur Über Nacht weitergeschüttelt. Nach

Zentrifugation der Kultur für 15 min. bei 6000 rpm im GSG 3-Rotor wird das Pellet in 2,5 ml 10 mM Tris-HCl pH=8, 25 % Sucrose suspendiert. Anschließend wird 0,45 ml Lysozym (5 mg/ml) zugegeben und die Suspension 5 min. auf Eis inkubiert. Dann werden 0,9 ml 0,25 M Tris, 0,25 M EDTA pH=8 zupipettiert und weitere 5 min. auf Eis inkubiert. Die Sphäroplastierung sollte nun abgeschlossen sein. Nach Zugabe von 3,6 ml Triton-puffer wird die Suspension gut durchmischt und nochmals 5 min. inkubiert. Wenn die Suspension eine hohe Viskosität erreicht hat, werden die Zellfragmente für 60 min. bei 15000 rpm abzentrifugiert. Nach der Zentrifugation wird der DNS-haltige Überstand vorsichtig abgegossen und Ethidiumbromid (300 µg/ml) zugegeben. Anschließend werden 0,903 g/ml CsCl zugegeben, das Gemisch in Polyallomer-Röhrchen überführt, mit Paraffin austariert und im TST 65 Rotor zentrifugiert (48 h bei 38000 rpm). Nach dieser Dichtegradientenzentrifugation wird die Plasmidbande abgezogen und das Ethidiumbromid durch mehrmaliges Ausschütteln mit Isoamylalkohol entfernt. Das CsCl wird durch Dialyse unter mehrmaligem Pufferwechsel entfernt. Die DNS wird in Gegenwart von 0,3 M Ammoniumacetat mit 2,5 Volumen Ethanol 30 min. bei -70°C gefällt. Sie wird, wie schon beschrieben, weiterbehandelt. Die Konzentration der isolierten DNS kann auf einem analytischen Agarosegel abgeschätzt werden.

4. DNS-Präparation (Minipräparation), modifiziert nach Birnboim und Doly (1979)

5 ml LB-Medium werden mit dem jeweiligen Stamm angeimpft und in Gegenwart von einem selektiven Antibiotikum Über Nacht inkubiert. Nach Zentrifugation der Kultur für 10 min. bei 5000 rpm in der Minifuge, wird das Pellet in 100 µl Lösung A suspendiert. Nach Inkubation für 5 min. bei Raumtemperatur werden 200 µl Lösung B zupipettiert, das Ganze gut durchmischt und weitere 5 min. bei Raumtemperatur stehengelassen. Lösung B sollte nie älter als eine Woche sein. Anschließend werden 150 µl Lösung C zugegeben und gemischt, so daß ein weißer Niederschlag ausfällt. Bei diesem Niederschlag handelt es sich um einen unlöslichen Protein-DNS-RNS-Komplex. Nach Inkubation für weitere 5 min. wird der Niederschlag in der Eppendorf-Zentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wird mit 2,5 Volumen Ethanol versetzt und 5 min. bei Raumtemperatur

stehengelassen. Nach Abzentrifugieren und Trocknen wird die DNS in 45 μ l quarzdestilliertem Wasser aufgenommen. Nach Inkubation mit 5 μ l RNase (10 mg/ml) für 15 min. bei 37°C wird der Ansatz phenolisiert und die DNS mit 2,5 Volumen Ethanol (96 %) ausgefällt.

5. Spaltung von DNS mit Restriktionsendonukleasen

Die zu spaltende DNS wird in dem entsprechenden Inkubationspuffer aufgenommen und mit 1 Einheit/ μ g DNS versetzt. Das Spaltvolumen richtet sich nach der Konzentration der DNS und beträgt zwischen 20 μ l und maximal 100 μ l. Nach einer Inkubation von etwa 3 h bei der jeweiligen Temperatur, kann die Vollständigkeit der Spaltung auf einem analytischen Agarosegel kontrolliert werden.

6. Präparation von Restriktionsfragmenten

Zur präparativen Auftrennung von DNS-Fragmenten wird die gespaltene DNS in eine entsprechend breite Tasche eines Agarosegels aufgetragen und eine Spannung von 60 V angelegt. Die DNS-Fragmente werden über der UV-Lampe mit einem Skalpell ausgeschnitten und die Agaroseblöckchen in einen Dialyseschlauch transferiert. Der Dialyseschlauch wird mit Puffer gefüllt, bis die Oberfläche des Agaroseblocks gerade bedeckt ist. Die DNS wird dann bei einer Spannung von 80 V aus dem Agaroseblock eluiert. Nach etwa einer Stunde kann die Vollständigkeit der Elution über der UV-Lampe kontrolliert werden. Nach Umpolen für 30 sec. kann die eluierte DNS mit einer Pasteurpipette aus dem Dialyseschlauch entnommen werden. Nach Abzentrifugieren der Agarose in der Eppendorf-Zentrifuge wird die DNS-haltige Phase phenolisiert und die DNS gefällt. Die Reinheit und die Konzentration der isolierten Fragmente kann auf einem analytischen Agarosegel überprüft werden.

7. Auffüllung Überstehender 5'-Enden mit dem Klenow-Fragment der DNS-Polymerase I

Präparativ gereinigte DNS-Fragmente werden zur Auffüllung der 5'-Enden in folgendem Ansatz mit dem Klenow-Fragment inkubiert:

5-10 ug DNS
5 ul Klenow-Fragment (1 U/ul)
2 ul XTP 2 mM
10 ul 5 x Klenowpuffer

Gesamtansatz: 50 ul

Eine 20 mM Lösung aus ATP, GTP, CTP, TTP wird vor Gebrauch 1:10 mit Klenowpuffer verdünnt. Davon werden 2 ul eingesetzt.

Nach einer Inkubation für 30 min. bei 37°C wird der Ansatz phenolisiert und die DNS gefällt.

8. Dephosphorylierung von DNS mit alkalischer Phosphatase

Linearisierte und präparativ gereinigte Vektor-DNS wird zur Verhinderung einer Selbstligation in folgendem Ansatz mit alkalischer Phosphatase inkubiert:

50 pMol DNS-Enden
5 ul 10 x Phosphatasepuffer
1 ul Phosphatase (1 U/ul)

Gesamtansatz: 50 ul

Der Ansatz wird 30 min. bei 37°C inkubiert, zur Entfernung der Phosphatase zweimal phenolisiert und die DNS, wie beschrieben, gefällt.

9. Verdauung von DNS mit Bal 31

EcoRI gespaltene und über ein präparatives Gel gereinigte Plasmid-DNS wird mit Bal 31 in folgendem Ansatz inkubiert:

7 ug DNS (2 pMol DNS Enden)
16 ul 5 x Bal 31 Puffer
0,8 ul Bal 31 (2 U/ul)

Gesamtansatz: 80 ul

Nach einer Inkubation von 30 min. bei 30°C wird die Reaktion durch Zugabe von 8 ul 200 mM EGTA pH=8 im Eisbad gestoppt. Anschließend werden 240 ul quartzdestilliertes Wasser zugegeben und die DNS gefällt.

10. Ligation

Ein präparativ gereinigtes DNS-Fragment wird mit ebenfalls präparativ gereinigter und mit alkalischer Phosphatase behandelter Vektor-DNS in folgendem Ansatz bei 4°C über Nacht inkubiert:

- x ul Vektor-DNS
- y ul DNS-Fragment
- 1 ul 10 x ATP (3,6 mg/ml)
- 1 ul 10 x Ligasepuffer
- 1 ul Ligase (1 bzw. 0,1 Unit)

Gesamtansatz: 10 ul

Bei DNS-Fragmenten mit Überstehenden Enden wird 0,1 Einheit Ligase zugesetzt, bei glatten Enden 1 Einheit. Bei einem DNS-Fragment, das gleich oder doppelt so groß wie der Vektor ist, wählt man ein Vektor:DNS-Verhältnis von 1:2, ansonsten ein Verhältnis von 1:4.

11. Transformation (Dagert u. Ehrlich 1979)

5 ml LB-Medium werden mit der jeweiligen Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer Dichte von 0,3 (580 nm) bei 37°C inkubiert. Danach zentrifugiert man 10 min. bei 2°C und 3000 rpm, nimmt das Sediment in 10 ml kaltem, sterilem 100 mM CaCl_2 auf, mischt vorsichtig und läßt die Zellsuspension noch 20-25 min. im Eis stehen. Dann werden die Zellen erneut abzentrifugiert (10 min., 3000 rpm) und in 0,5 ml kaltem 100 mM CaCl_2 aufgenommen. Die Zellsuspension läßt man nun 3 h im Eis stehen, damit die Zellen das Kompetenzstadium erreichen. Zu 100 ul kompetenten Zellen pipettiert man 1 ug DNS, läßt die Zellsuspension 10 min. im Eis stehen und erhitzt anschließend den Ansatz 40 sec auf 42°C. Dann gibt man 2 ml LB-Medium zu und schüttelt die Zellsuspension 1 h bei 37°C. 0,1 bzw. 0,2 ml werden auf die jeweiligen Selektionsplatten ausplattiert.

12. Agarose-Gelelektrophorese

Bei einer Agarose-Gelelektrophorese werden DNS-Fragmente nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Je nach dem Größenbereich der Fragmente werden 0,8-2 g Agarose werden in 90 ml destilliertem Wasser unter Kochen gelöst. Dann gibt man 10 ml 10 x Elektrophoresepuffer und 50 ul Ethidiumbromid (1 mg/ml)

zu. Vor dem Gießen des Gels wird zum Formen der Taschen ein Kamm eingesetzt. Für kleine Flachgele gießt man 15 ml, für große Flachgele 25 ml Agarose ein. Nach dem Erstarren der Agarose wird der Kamm herausgezogen und Elektrophoresepuffer eingefüllt. Die Proben werden mit 1/10 Volumen Farbmarker versetzt und mit einer Glaskapillare aufgetragen. Die Auftrennung der DNS-Fragmente erfolgt bei einer Spannung von 80 V. Nach Beendigung der Elektrophorese können die DNS-Fragmente durch das eingelagerte Ethidiumbromid über der UV-Lampe sichtbar gemacht werden.

13. Sequenzierung nach Sanger (1977, 1980)

13.1 Isolierung des Phagenvektors mp19

1,5 l LB-Medium werden mit 15 ml Übernachtskultur von JM101 und 15 ml des jeweiligen Phagenlysats (etwa 10^{11} pfu/ml) beimpft. Nach einer Inkubation von 5 h bei 37°C wird die Kultur abzentrifugiert (15 min. bei 6000 rpm). Das Pellet wird analog der Isolierung von Plasmid-DNS weiterverarbeitet.

13.2 Transfektion

Der Ligationsansatz wird zu 200 µl kompetenten Zellen von JM101 pipettiert und 10 min. ins Eis gestellt. Anschließend werden die Zellen 3 min. auf 42°C erhitzt und zu 3 ml Weichagar pipettiert. Nach Zugabe von 20 µl IPTG (20 mg/ml) und 20 µl X-Gal (20 mg/ml) wird die Zellsuspension auf eine LB-Platte abgegossen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

13.3 Präparation der Templates

2 ml LB-Medium werden mit 20 µl Übernachtskultur von JM101 und einem weißen Plaque beimpft. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C werden 1,5 ml der Kultur in der Eppendorf-Zentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand, der die Phagen enthält, wird zu 300 µl 2,5 M NaCl, 20% PEG 6000 pipettiert, gut umgeschüttelt und zur Fällung der Phagen 15 min. bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach Zentrifugation für 5 min. in der Eppendorf-Zentrifuge, wird der Überstand mit einer Pateurpipette an der Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Die Zentrifugation wird wiederholt und der verbliebene Überstand nochmals abgesaugt. Das Pellet wird in 100 µl TE aufgenommen und gut gelöst. Nach Phenolisierung und Fällung der DNS mit

96% Ethanol wird die Einzelstrang-DNS in 50 μ l TE aufgenommen.

13.4 Annealing

Der Primermix für das Annealing besteht aus folgendem Ansatz:

Für 6 Templates: 8 μ l Primer

5 μ l 10 x Annealingpuffer

37 μ l H₂O quartzdest.

Beim Annealing werden 7,5 μ l Primermix und 5 μ l Template in eine Kapillare eingeschmolzen, kurz aufgekocht und bei Raumtemperatur abgekühlt. Die Templatekonzentration beträgt bei Markierung mit ³²P-dATP 1 μ g/ μ l, bei Markierung mit ³⁵S-dATP 3 μ g/ μ l.

13.5 Sequenzierungsreaktion

Für 2 Templates:

Polymerase/³²P Mix:

1 μ l Klenow-Fragment (5 U/ μ l)

1 μ l ³²P-dATP (10 μ Ci/ μ l)

16 μ l 10 mM Tris-HCl pH=7,5

Für 6 Templates:

Polymerase/³⁵S Mix:

2 μ l Klenow-Fragment

3 μ l a-³⁵S-dATP (10 μ Ci/ μ l)

50 μ l 10mM Tris-HCl pH=7,5

1 μ l 0,1 M DTT

Für die Sequenzierungsreaktion werden jeweils 2 μ l der Annealingreaktion, der einzelnen Nukleotidgemische und des Polymerase/³²P bzw. ³⁵S Mixes zusammenpipettiert und 20 min. bei 37°C inkubiert. Dann gibt man 2 μ l Chaselösung zu und inkubiert die Ansätze weitere 15 min. bei 37°C. Schließlich werden 6 μ l Farbmarker zupipettiert, die Proben 3 min. auf 90°C erhitzt und davon 2 μ l auf das Sequenzgel aufgetragen.

13.6 Gießen eines Sequenzgels (modifiziert nach Maxam u. Gilbert 1980, Garoff u. Ansorge 1981)

Nach dem gründlichen Reinigen der Platten (Länge: 40 cm), wird die Deckplatte siliconisiert und die Unterplatte silanisiert. Die Gele werden als "Keilgele" (Dicke am oberen Gelende: 0,4 mm, unten: 0,6 mm) hergestellt. Dabei wird die Deckplatte über die Unterplatte, auf die flüssige Gellösung aufgegossen ist,

geschoben. Es wird eine Gelkonzentration von 6% Polyacrylamid verwendet. Nach einem Vorlauf von 30 min. bei 30 Watt werden Proben von jeweils 2 μ l aufgetragen. Die Elektrophorese dauert 2 h bei 30 W, bis das Bromphenolblau ausgetreten ist. Nach Beendigung der Elektrophorese wird das Gel 15 min. in 10% Essigsäure fixiert, gut mit dest. Wasser gespült und 1,5 h bei 80°C getrocknet. Anschließend kann ein Röntgenfilm aufgelegt werden.

14. Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität

Die β -Galaktosidaseaktivität wird nach der Methode von Miller (1972) bestimmt. 5 ml Minimal-Medium A, das supplementiert ist mit MgSO_4 (1 mM), Glucose (0,2 %), Vitamin B1 (1 $\mu\text{g/ml}$) und den jeweils notwendigen Aminosäuren, wird 1:100 mit dem zu testenden Stamm beimpft. Wenn die Bakterienkultur eine optische Dichte von 0,6 bei 600 nm erreicht hat, werden Aliquots entnommen. Stämme mit hoher β -Galaktosidaseaktivität werden 1:10, solche mit niedriger Aktivität 1:1 mit Z-Puffer verdünnt. Zu jedem Ansatz werden 3 Tropfen Toluol gegeben und das Gemisch 10 min. bei 37°C inkubiert. Anschließend werden die Röhrchen 5 min. in ein Wasserbad von 28°C gestellt. Dann werden 0,2 ml ONPG (4 mg/ml) zu jedem Röhrchen pipettiert, kurz geschüttelt und die Reaktion gestartet. Kurz bevor die Gelbfärbung ihre höchste Intensität erreicht hat, wird die Enzymreaktion durch Zugabe von 0,5 ml 1 M Na_2CO_3 gestoppt. Durch Vorversuche wurde die Zeit für den Ablauf der Enzymreaktion ermittelt. Dann wird die optische Dichte bei 420 nm und 550 nm gemessen. Wenn man die Verdünnung, die Zeit der Reaktion und die jeweiligen Werte für die optische Dichte in die Formel von Miller einsetzt, kann die β -Galaktosidaseaktivität ermittelt werden.

$$\text{Einheiten an } \beta\text{-Galaktosidase} = \frac{1000 \times \text{OD}_{420} - 1,75 \times \text{OD}_{550}}{t \times v \times \text{OD}_{600}}$$

t: Zeit der Reaktion in Minuten

v: Volumen der Kultur in ml

15. in vitro-Verpackung von L-DNS

15.1 Herstellung von Zellextrakten

Zur Herstellung von Zellextrakten wird der Salmonella -Stamm DB5575 verwendet, da er keine Endonukleaseaktivität hat (Schumann u. Bade 1977). Die Bakterienkultur wird bis zu einer Zelldichte von 2×10^8 Zellen/ml ($OD = 0,2$ bei 580 nm) in LB-Medium bei $37^\circ C$ inkubiert. Dann erfolgt die Infektion mit am3am13 bzw. am2am13 Phagen ($moi=5$). 90 min. nach der Infektion wird die Kultur im GSG 3-Rotor abzentrifugiert (10 min. bei 6000 rpm). Das Zellpellet wird in 1/250 Volumen Verpackungspuffer ohne ATP suspendiert und in kleinen Portionen zu 25 μ l bei $-80^\circ C$ eingefroren.

15.2 in vitro-Verpackung

Das Prinzip der in vitro-Verpackung beruht auf der Komplementation zweier Zellextrakte.

Es wird folgender Verpackungsansatz gewählt:

25 μ l Extrakt A (z.B. am3am13)

25 μ l Extrakt B (z.B. am2am13)

12 μ l Verpackungspuffer

7 μ l ATP

1 μ l L-DNS (1 μ l/ μ l)

Der Verpackungsansatz wird 3 mal in flüssigem Stickstoff eingefroren, im Eiswasserbad aufgetaut und danach 45 min. bei $30^\circ C$ inkubiert. Die entstandenen Phagenpartikel werden auf His(sie) als Indikatorstamm ausplattiert. Der Salmonella-Stamm His(sie) ist lysogen für den Phagen P22(sie), welcher in den "superinfection exclusion"-Systemen A und B defekt ist. Phagen mit P22 Immunität werden durch den Repressor des Prophagen an der Vermehrung gehindert. Phagen mit L-DNS können sich dagegen ungehindert vermehren, da dieser Phage eine andere Immunitätsregion als P22 besitzt.

16. Isolierung von Minizellen

Um bei der Isolierung eine möglichst hohe Ausbeute an Minizellen zu erzielen, ist es wichtig, daß man zunächst die Einzelkolonien des minizellproduzierenden Stammes unter dem Mikroskop betrachtet und das Verhältnis von normalen zu Minizellen abschätzt.

150 ml ENB-Medium werden mit einer gut produzierenden

Einzelkolonie beimpft und in einem 2 l Kolben über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Die Übernachtskultur wird im GSG 3-Rotor abzentrifugiert (10 min., 6000 rpm), das Sediment gut in 10 ml BSG-Puffer resuspendiert und die Zellen 10 min. bei 13000 rpm zentrifugiert. Das Zellsediment wird dann in 2 ml BSG-Puffer aufgenommen und mit Hilfe einer Pasteurpipette auf einen Sucrosegradienten (5%-20%) aufgegeben. Um die unterschiedlichen Zelltypen voneinander zu trennen, zentrifugiert man in der Minifuge für 15 min. bei 6000 rpm. Nach der Zentrifugation erhält man folgende Auftrennung der verschiedenen Zelltypen voneinander (Abb.4):

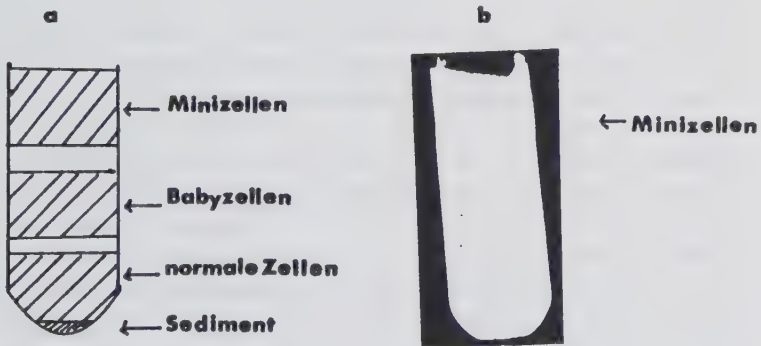


Abb.4a : Ideale Trennung von Mini-, "Baby"- und normalen Zellen nach einer Sucrosegradientenzentrifugation. Unter Babyzellen versteht man Zellen, die etwas größer als Minizellen, jedoch im Gegensatz zu diesen teilungsfähig sind. Man erhält jedoch kaum eine so ideale Trennung, wie sie Abb.4a zeigt, sondern die Fotografie (Abb.4b) entspricht eher der Praxis.

Die gut sichtbare Minizellbande (Abb.4b) wird mit einer Pasteurpipette abgezogen und die Zellen werden 10 min. bei 13000 rpm abzentrifugiert. Das Zellsediment nimmt man in 1 ml BSG-Puffer auf und gibt die Zellsuspension nach gründlicher Resuspendierung erneut auf einen Sucrosegradienten. Nach 2 bzw. 3 Sucrosegradienten zieht man die Minizellbande wiederum ab und mikroskopiert die Probe. Es sollte keine normale Zelle

zu erkennen sein. Nach dem Abzentrifugieren werden die Zellen in 1 ml Methionin Assay Medium aufgenommen und die optische Dichte auf 0,6 bei 600 nm eingestellt (etwa 10^9 Minizellen/ml). Von der eingestellten Minizellsuspension legt man eine Verdünnungsreihe an (Endverdünnung 10^{-6}) und plattiert auf entsprechenden Selektionsplatten aus. Das Verhältnis normaler Zellen zu Minizellen sollte nicht größer als $5:10^6$ sein.

Die Minizellen können nun entweder sofort für eine Markierung mit ^{35}S -Methionin herangezogen werden oder zu je 1 ml in 20% Glycerin bei -70°C eingefroren werden.

16.1 Markierung der Minizellen

1 ml Minizellen, die gegebenenfalls in 20% Glycerin bei -70°C eingefroren waren, werden abzentrifugiert, in 1 ml Methionin Assay Medium aufgenommen und 30 min. bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 10 uCi ^{35}S -Methionin (1023 Ci/mmol) werden die Zellen weitere 30 min. bei 37°C inkubiert. Dann werden 100 ul L-Methionin (2 mg/ml) zupipettiert und die Zellen nach weiteren 30 min. Inkubation in der Eppendorf-Zentrifuge abzentrifugiert. Das Pellet wird in 40-45 ul Laemmli-Puffer aufgenommen und 2 min. gekocht.

16.2 Bestimmung der eingebauten Radioaktivität

5 ul Zellysat werden mit 0,5 ml 0,1% Rinderserumalbumin als Carrier versetzt und nach der Fällung mit 5 ml kochender 20%iger TCA 10 min. im Eis stehen gelassen. Anschließend wird die Suspension in einer Hölzl-Filterapparatur durch Whatman GF/C Glasfaserfilter, die in 5%iger TCA vorgeweicht werden, abgesaugt und der Niederschlag 2 mal mit je 10 ml 5%iger TCA und 2 mal mit je 10 ml Ethanol/Äthergemisch (9:1) nachgewaschen.

Die Filter werden bei 80°C getrocknet und in ein Zählgläschen, das 5 ml Szintillationsflüssigkeit enthält, gegeben. Die Radioaktivität der einzelnen Proben wird im ^{14}C -Kanal bestimmt.

17. Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford 1976)

Der Proteintest nach Bradford wird durch eine hohe Konzentration an Detergens, z.B. 1% Triton, 1% SDS, gestört.

Eine niedrige Detergenskonzentration, hohe Konzentrationen an Salz (5 M NaCl), an Sucrose (1 M) oder an Tris (2 M) beeinträchtigen den Test nicht. Dieser Proteinassay dient zur Bestimmung von Proben mit einem Proteingehalt von 1-30 µg/ul. Die jeweilige proteinhaltige Probe wird in Wassermannröhrchen pipettiert und mit dem Probenpuffer auf 0,1 ml aufgefüllt. Dann werden 1 ml Proteinreagenz zugegeben, kurz durchmischt und nach 5 min. die optische Dichte bei 595 nm gemessen. Bei jeder Proteinbestimmung werden verschiedene Konzentrationen an BSA als Eichprotein mitbestimmt. Aus der an Hand von BSA als Eichprotein ermittelten Eichkurve können die Proteinkonzentrationen der Proben bestimmt werden. Die optische Dichte der Farbtintensität bei 595 nm bleibt zwischen 5 und 20 min. unverändert.

18. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese für Proteine (Laemmli 1970)

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese für Proteine wurde in einer vertikalen Gelapparatur nach der Vorschrift von Laemmli (1970) durchgeführt.

Zuerst wird das Trenngel zusammenpipettiert und nach Eingießen in die Gelkammer mit 2 ml H_2O deion. überschichtet. Nach vollständiger Polymerisation des Trenngels (30 min. bis 1 h) kann das Sammelgel eingefüllt werden. Nach Polymerisation des Sammelgels werden der Laufpuffer eingefüllt und die Proben aufgetragen (15-20 µl). Die Trennbedingungen sind 19 h bei 30 V oder 4 h bei 150 V.

18.1. Färben von Proteingelen

18.1.2. Coomassiefärbung

Nach Beendigung der Elektrophorese wird das Gel für etwa 30 min. mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt. Nach dem Entfärben in 10 % Essigsäure, kann das Gel getrocknet und zur Sichtbarmachung der radioaktiven Proteine ein Röntgenfilm aufgelegt werden. Statt der Trocknung des Gels kann auch eine Silberfärbung angeschlossen werden.

18.1.3. Silberfärbung

Für die Silberfärbung wurde ein Farbe-Kit der Firma Bio-Rad verwendet. Die Färbung basiert im wesentlichen auf einer

Methode von Merril (Merril et al. 1981, Switzer et al. 1979). Um schärfere Proteinbanden zu erhalten, ist es von Vorteil, die Silberfärbung erst nach einer Coomassiefärbung durchzuführen (Görg et al. , Warm et al. , LKB Workshop 1985). Nach vollständiger Entfärbung des Proteingels mit 10 % Essigsäure wird das Gel 2 x für 30 min. in 10 % Ethanol und 5 % Essigsäure gelegt. Danach erfolgt eine 5 minütige Behandlung mit 1:10 verdünnter Oxidierlösung (0,1 % Kaliumdichromat, 0,02 % Salpetersäure). Das Gel wird nun 3 x 10 min. mit dest. Wasser gewaschen und anschließend 20 min. mit 1:10 verdünntem Silberreagenz (0,2 % Silbernitrat) behandelt. Nach erneutem Waschen (3 x 10 min.) mit dest. Wasser wird 3 x in fünfminütigem Intervall Entwickler (3,9 % Kupfersulfat, 3,9 % Natriumchlorid, 45,8 % Natriumthiosulfat in 25 % Ammoniaklösung) zugegeben. Wenn die Proteine gut sichtbar sind, wird das Gel kurz mit H₂O deion. gewaschen und die Reaktion durch Zugabe von 5 % Essigsäure abgestoppt.

18.2. Trocknung und Autoradiographie von Proteingelen

Zum Trocknen wird das Gel in eine feuchte Cellophanfolie eingepackt und zwischen zwei feuchten Whatman-Papieren, auf denen noch eine Plastikscheibe liegt, auf dem Geltrockner (Bio-Rad) getrocknet.

Das Trocknen des Gels dauert 90 min., wobei Voraussetzung für einen guten Trocknungsvorgang ein gleichmäßiges Vakuum ist. Das getrocknete Gel wird zwischen eine Verstärkerfolie (Dupont Cronex HI Plus) und einen Röntgenfilm (Kodak X-Omat) gelegt, lichtdicht verpackt und bei -70 °C exponiert. Je nach Stärke der Markierung beträgt die Exposition zwischen 3 Tagen und 2 Wochen.

19. Präparation von Säulenmaterialien und Packung der Säule

Alle Säulenmaterialien müssen vor dem Gebrauch von Feinpartikeln befreit werden, um eine genügend hohe Durchflußrate zu gewährleisten. Dazu läßt man das Material in genügend Puffer über Nacht quellen. Der Überstand wird abgesaugt und erneut mit Puffer equilibriert. Der Vorgang wird 2 mal wiederholt. Die Säulenmaterialien und alle für die Chromatographie verwendeten Puffer müssen entgast werden,

damit die Säule luftblasenfrei gepackt werden kann. Zur Konservierung wird das Säulenmaterial mit 0,02 % Natriumazid versetzt.

19.1 Gelfiltration mit Sephadex G50 und Sephadex G75

Bei einer Gelfiltration werden Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Sephadex G50 Fine von Pharmacia Fine Chemicals eignet sich für eine Auftrennung von Proteinen zwischen 1.500-30.000 D. Behandelt man das Gel vor, wie schon beschrieben, so ergibt sich ein Säulenvolumen von 9-11 ml/g Trockengewicht. Die entgaste Sephadexsuspension wird in eine LKB-Säule von 1,6 cm x 95 cm gegossen. Nach der Packung, die mit einer peristaltischen Pumpe bei einer Geschwindigkeit von 7,5 ml/h erfolgte, wurde eine Betthöhe von 89 cm erreicht. Sephadex G75 Superfine dient zur Auftrennung von Proteinen im Bereich von 3000-70.000 D. Behandelt man das Gel nach der Vorschrift, so ergibt sich ein Säulenvolumen von 12-15 ml/g Trockengewicht. Nach der Packung der Säule, wie schon beschrieben, wird ebenfalls eine Betthöhe von 89 cm erreicht. Sephadex G75 Fine trennt Proteine im Bereich von 3000-80.000 D. Das entgaste Säulenmaterial wird in eine LKB-Säule von 1,6 cm x 65 cm gegossen. Nach der Packung wird eine Betthöhe von 60 cm erreicht.

Sofort nach der Packung wird die Säule mit Säulenpuffer equilibriert. Die Eichung der Säule erfolgt durch jeweils getrenntes Auftragen von 3 mg/2 ml Dextranblau (MG:2.000.000 D) bzw. 3 mg/2 ml Myoglobin (MG:17.800 D). Es ist sinnvoll, die Gelfiltration von Dextranblau ohne Myoglobin durchzuführen, da sonst auf Grund einer Komplexbildung beider Proteine die Ausschußfront nicht genau ermittelt werden kann. Die Gelchromatographie erfolgt über Nacht bei einer Pumpgeschwindigkeit von 7,5 ml/h. Es werden Fraktionen zu 1 ml gesammelt.

19.2. Affinitätschromatographie mit Heparin Sepharose CL 6B

Heparin ist ein Mucopolysaccharid, das für die Reinigung von DNS-bindenden Proteinen verwendet wird. Nach Vorbehandlung des Gelmateri als ergibt sich ein Säulenvolumen von 4 ml/g Trockengewicht. Das entgaste Säulenmaterial wird in eine

1 cm x 10 cm Säule von Pharmacia gegossen. Nach der Packung mit einer peristaltischen Pumpe bei einer Geschwindigkeit von 5 ml/h wird eine Betthöhe von 7 cm erreicht. Die Regenerierung der Säule erfolgt durch alternatives Waschen mit 0,1 M Na-Acetat, 0,5 M NaCl pH=5 und 0,1 M Tris-HCl, 0,5 M NaCl pH=10 (jeweils 15 Säulenvolumen). Anschließend wird die Säule mit Säulenpuffer neutralisiert.

19.3 Affinitätschromatographie mit DNS-Cellulose

DNA-Cellulose enthält 0,25-1,5 mg nativer Kalbsthymus DNS/ml Gel. Es wird, ebenso wie Heparin, für die Reinigung von DNS-bindenden Proteinen verwendet. Das Säulenmaterial ist bereits gequollen und wird als Suspension geliefert. Es wird, wie schon beschrieben, weiterbehandelt und nach Entgasung in eine 0,7 cm x 10 cm Bio-Rad Econo Säule gegossen. Nach der Packung bei einer Geschwindigkeit von 2,5 ml/h wird eine Betthöhe von 7,5 cm erreicht. Die Regenerierung der Säule erfolgt analog der Affinitätschromatographie mit Heparin Sepharose CL 6B.

20. Isolierung des Proteins gp3

20.1 Rohextrakterstellung

2 l LB-Medium werden in Gegenwart von 100 ug/ml Ampicillin 1:100 mit dem jeweiligen Salmonella -Stamm beimpft und bei 37°C geschüttelt. Nach Erreichen einer optischen Dichte von 0,6 bei 580 nm wird die Kultur mit am2am13 Phagen (moi=10) infiziert. 20 min. nach der Infektion wird die Bakterienkultur im GSG 3-Rotor abzentrifugiert (10 min. bei 6000 rpm). Das Pellet wird in 8 ml Verpackungspuffer aufgenommen, der mit 20 mM MgCl₂, 0,1 mM PMSF, 0,01 % Tween 80 supplementiert ist. Nach dreimaligem Einfrieren und Auftauen in flüssigem Stickstoff sind die Zellen vollständig aufgebrochen. Der Rohextrakt wird 1:1 bis 1:2 mit 25 mM Tris-HCl pH=7,5, 20 mM MgCl₂, 1 mM PMSF, 0,01 % Tween 80, 3 mM β -Mercaptoethanol verdünnt und im SW 27.1 Rotor 2 h bei 25000 rpm zentrifugiert. Dabei sedimentieren die Zellfragmente und Membranen.

20.2. Streptomycinsulfatfällung

Bei der Isolierung eines DNS-bindenden Proteins ist es wichtig, die DNS aus dem Zellextrakt zu entfernen, da sonst keine spezifische Bindung an die Säule erfolgen kann. Die Fällung der DNS mit Streptomycinsulfat erfolgt in folgendem Ansatz:

- x ml UZ-Überstand (das Volumen des UZ-Überstands ist unterschiedlich)
- 4,56 ml 5 M NaCl (Endkonzentration: 0,6 M)
- 3 ml 25 % Streptomycinsulfat (Endkonzentration: 2 %) in Puffer gelöst
- y ml Puffer (25 mM Tris-HCl pH=7,5, 20 mM $MgCl_2$, 0,1 mM PMSF, 3 mM β -Mercaptoethanol)

Gesamtansatz: 38 ml

Der Puffer (y ml) dient zum Auffüllen auf 38 ml Gesamtansatz. Die Streptomycinsulfatlösung wird tropfenweise unter langsamem Rühren im Eisbad zugegeben. Nach 1 h Rühren im Eisbad wird die DNS abzentrifugiert (10 min. bei 10000 rpm).

20.3 Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung

Das Volumen des Überstands nach der Streptomycinsulfatfällung wird genau bestimmt. Dann werden 16,4 g/ml Ammoniumsulfat innerhalb von 20 min. unter langsamem Rühren im Eisbad zugegeben. Dabei wird eine 30%ige Sättigung mit Ammoniumsulfat erreicht. Nach 1 h Rühren im Eisbad werden die ausgefällten Proteine abzentrifugiert (10 min. bei 18000 rpm). Der Überstand wird wiederum genau gemessen und 18,1 g/ml Ammoniumsulfat innerhalb von 20 min. unter langsamem Rühren zugegeben. Dadurch wird eine 60%ige Sättigung mit Ammoniumsulfat erzielt. Das Genprodukt 3 fällt zwischen 30% und 60% Sättigung mit Ammoniumsulfat aus. Nach 1 h Rühren im Eisbad werden die ausgefällten Proteine abzentrifugiert (10 min. bei 20000 rpm) und in 7 ml 25 mM Tris-HCl pH=7,5, 20 mM $MgCl_2$, 0,01 % Tween 80, 0,1 mM PMSF, 3 mM β -Mercaptoethanol gut suspendiert. Das Ammoniumsulfat wird durch Dialyse über Nacht entfernt (2-3 mal Pufferwechsel). Die Ammoniumsulfatfraktion kann entweder bei $-20^{\circ}C$ eingefroren oder weiterverwendet werden.

20.4. Affinitätschromatographie mit Heparin Sepharose CL 6B

Die dialysierte Ammoniumsulfatfraktion wird mit Säulenpuffer auf 10 ml aufgefüllt und mit einer Geschwindigkeit von 5 ml/h bei 4°C auf eine 5,5 ml Heparinsäule gepumpt. Anschließend wird mit 16 ml Säulenpuffer nachgewaschen und ein Salzgradient von 0-1 M NaCl angelegt. Die Affinitätschromatographie erfolgt über Nacht und dauert 8 h. Es werden Fraktionen von jeweils 1 ml aufgefangen. Durch Leitfähigkeitsmessungen (WTW Konduktometer LF 42) werden die Fraktionen zwischen 0,4 M und 0,8 M NaCl ermittelt und dialysiert. Nach der Dialyse können die Fraktionen im in vitro-Verpackungsassay auf ihre gp3-Aktivität getestet werden. Die Dialyse ist unbedingt notwendig, da der in vitro-Verpackungsassay durch hohe Salzkonzentrationen gestört wird. Die einzelnen Säulenfraktionen werden nach dem Aktivitätstest bei -20°C eingefroren.

20.5. Affinitätschromatographie mit DNS-Cellulose

Die aktivsten Fraktionen der Heparinsäule werden mit einer Geschwindigkeit von 2,5 ml/h auf eine 2,9 ml DNA-Cellulose-Säule gepumpt. Anschließend wird mit 8 ml Säulenpuffer nachgewaschen. Es werden Fraktionen von jeweils 1 ml aufgefangen. Da das Genprodukt 3 (s. Ergebnisteil) nicht an die Säule bindet, können die einzelnen Fraktionen im Durchlauf sofort getestet werden. Die aktivsten Fraktionen werden gepoolt und bei -20°C eingefroren.

20.6 Gelfiltration mit Sephadex G50 und G75

Bei einer Gelchromatographie werden Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Nach einer Empfehlung von Pharmacia sollte man folgende Kriterien bei der Durchführung einer Gelfiltration beachten:

- 1.) Die Probe sollte dieselbe Viskosität wie der Säulenpuffer besitzen.
- 2.) Das Volumen der Probe sollte 1-5% des Säulenvolumens betragen.
- 3.) Die Ionenstärke des Säulenpuffers sollte größer als 0,02 sein.

Die aktivsten Fraktionen der Heparinsäule werden durch Ultrafiltration in einer Amiconkammer konzentriert, bis ein Volumen von 5 ml erreicht ist. Die konzentrierte Probe wird entweder auf eine Sephadex G50 oder auf eine Sephadex G75-Säule aufgetragen. Die Trennung der Proteine erfolgt über Nacht mit einer Geschwindigkeit von 7,5 ml/h bei 4°C. Auf Grund der Eichung der Säule mit Dextranblau bzw. Myoglobin können die jeweiligen Säulenfraktionen durch in vitro-Verpackung von L-DNS auf ihre gp3-Aktivität getestet werden. Die aktivsten Fraktionen werden gepoolt und bei -20°C eingefroren.

21. Quantifizierung von Proteinen durch densitometrische Messung

Die quantitative Auswertung des Minizellautoradiogramms erfolgte mit Hilfe eines LKB Ultro Scan Laser Densitometers.

22. Verwendete Abkürzungen

am	amber
Ap	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Bis	N, N'-Methylenbisacrylamid
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
β -Gal	β -Galaktosidase
Ci	Curie
D	Dalton
DMF	Dimethylformamid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
(d)dNTP	(Di)desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	Dithiotreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
erf	essential recombination function
ETOH	Ethanol
gpX	Genprodukt des Gens X
h	Stunde
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid
KBp	Kilobasenpaare
KD	Kilo Dalton
lac	Laktose
lacO	lac-Operator
lacP	lac-Promoter
lacZ	β -Galaktosidase Gen
M	molar
mM	millimolar
Md	Megadalton
MG	Molekulargewicht
min.	Minuten
moi	multiplicity of infection
NG	N-methyl-N'-nitro-N-Nitrosoguanidin
ONPG	o-Nitrophenyl- β -D-Galactosid
PAA	Polyacrylamid
pfu	plaque forming units
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid

rpm	Umdrehungen pro Minute
sec	Sekunden
SD	Shine-Dalgarno
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tc	Tetracyclin
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N, N, N, N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Enzymeinheit (Unit)
V	Volt
W	Watt
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galaktosid

C. Ergebnisse

a) Steigerung der Expression des Genprodukts 3 von P22 und den P22 Mutanten HT12/4 und NT1/1

1. Problemstellung

Casjens u. King (1974) infizierten den Salmonella -Stamm TA1530 nach UV-Bestrahlung mit dem Phagen P22 bzw. einer P22 Mutante, die eine Ambermutation im Gen 3 trägt. Sie wählten den Stamm TA1530, da er durch die Deletion des *uvrB* Gens eine erhöhte UV-Sensibilität hat. Bestrahlt man diesen Bakterienstamm mit einer vorher genau ausgetesteten UV-Dosis, so wird das Chromosom so stark geschädigt, daß die Synthese von chromosomal kodierten Genprodukten vollständig abgeschaltet ist. Nach Phageninfektion werden deshalb in erster Linie phagenspezifische Proteine gebildet. Durch einen Vergleich der P22 spezifischen Proteine mit den Proteinen der Mutante im Gen 3 konnten sie das Genprodukt 3 erstmals auf dem SDS-Polyacrylamidgel identifizieren. Wenn die Synthese von chromosomal kodierten Proteinen nicht durch UV-Strahlung reprimiert wird, ist die Identifizierung des Proteins gp3 auf einem Proteingel nicht möglich. Ihre Experimente zeigen, daß dieses Protein vom Phagen in sehr geringer Menge exprimiert wird. Im Vergleich zum gut exprimierten Hauptkopfprotein gp5 findet man ein Expressionsverhältnis gp3:gp5 von 1:400 (H.Schmieger, pers. Mitteilung).

Youderian u. Susskind (1980) identifizierten mit derselben Technik, die auch Maxizellmethode genannt wird, mehrere späte Genprodukte von P22. Bei ihren Proteinauftrennungen konnten sie ebenfalls das Protein gp3 auf dem SDS-Polyacrylamidgel nachweisen. Das Molekulargewicht dieses Proteins wurde mit 17.000 D festgestellt.

Um ein Protein, das in so geringer Menge gebildet wird, charakterisieren zu können, schien es mir zweckmäßig, ein geeignetes Vektorsystem zu konstruieren, mit dem eine Expressionssteigerung des Proteins gp3 möglich war.

2. **Allgemeine Kriterien für eine Expressionssteigerung**
B-Interferon, Humaninsulin und das menschliche Wachstumshormon gehören zu den bekanntesten Beispiele für Proteine, deren Expression optimiert werden konnte (Guarente et al. 1980, Amann et al. 1983). Damit ein Protein überexprimiert werden kann, muß das entsprechende Gen effizient transkribiert und die gebildete mRNA optimal translatiert werden. Die Transkription ist u.a. abhängig von der Stärke des Promoters. Starke Promotoren, z.B. der P_L - bzw. P_R -Promoter von Lambda (Zabeau u. Stanley 1982, Remaut et al. 1981), der lac-Promoter (Guarente et al. 1980), der tac-Promoter (Amann et al. 1981) werden häufig zur Expressionssteigerung benutzt. Da die Überexpression eines Proteins auch letal für eine Bakterienzelle sein kann, ist es zweckmäßig, die Expression zu kontrollieren. Die Expression eines Proteins wird beim tac- bzw. lac-Promoter durch den lac-Repressor reguliert. Durch Zugabe von Laktose oder IPTG wird die Konformation des Repressors so verändert, daß er nicht mehr an den lac-Operator binden kann. Das jeweilige Gen kann dann transkribiert werden. Beim P_L - bzw. P_R -Promoter von Lambda erfolgt die Kontrolle der Expression eines Proteins durch den temperatursensitiven cI Repressor. Bei 28°C liegt der Repressor an den Operator gebunden vor, während er bei 42°C inaktiviert wird. Bei 42°C kann deshalb das jeweilige Gen abgelesen werden. Die Translation ist u.a. abhängig von der "Güte" der Ribosomenbindungsstelle (Shine-Dalgarno-Sequenz = SD-Sequenz) und vom Abstand der Shine-Dalgarno-Sequenz vom Startcodon (Looman et al. 1985). Die SD-Sequenz besteht aus einer Sequenz von 3-9 Bp und ist komplementär zu Nukleotiden am 3'Ende der ribosomalen 16 S rRNA (Shine u. Dalgarno 1974).
Guarente et al. (1980) gelang es, die Expression von Kaninchen-B-Globin auf 10.000-15.000 Monomere pro Escherichia coli Zelle zu steigern. Sie konstruierten ein Vektorsystem, bei dem ein lac-Promoterfragment, das neben dem lac-Promoter und dem lac-Operator auch die SD des lacZ-Gens enthielt, 10 Bp vor das Startcodon des B-Globingens gesetzt war. Durch diese Konstruktion wurde eine hybride Ribosomenbindungsstelle geschaffen, die aus der SD-Sequenz des lacZ-Gens und dem Startcodon von B-Globin besteht. Auf ähnliche Weise optimierten sie auch die Expression von B-Interferon und des

SV40 t Antigens.

Ich versuchte analog der Publikation von Guarente et al. 1980 einen Vektor zu konstruieren, mit dem ich die Expression des Proteins gp3 steigern konnte.

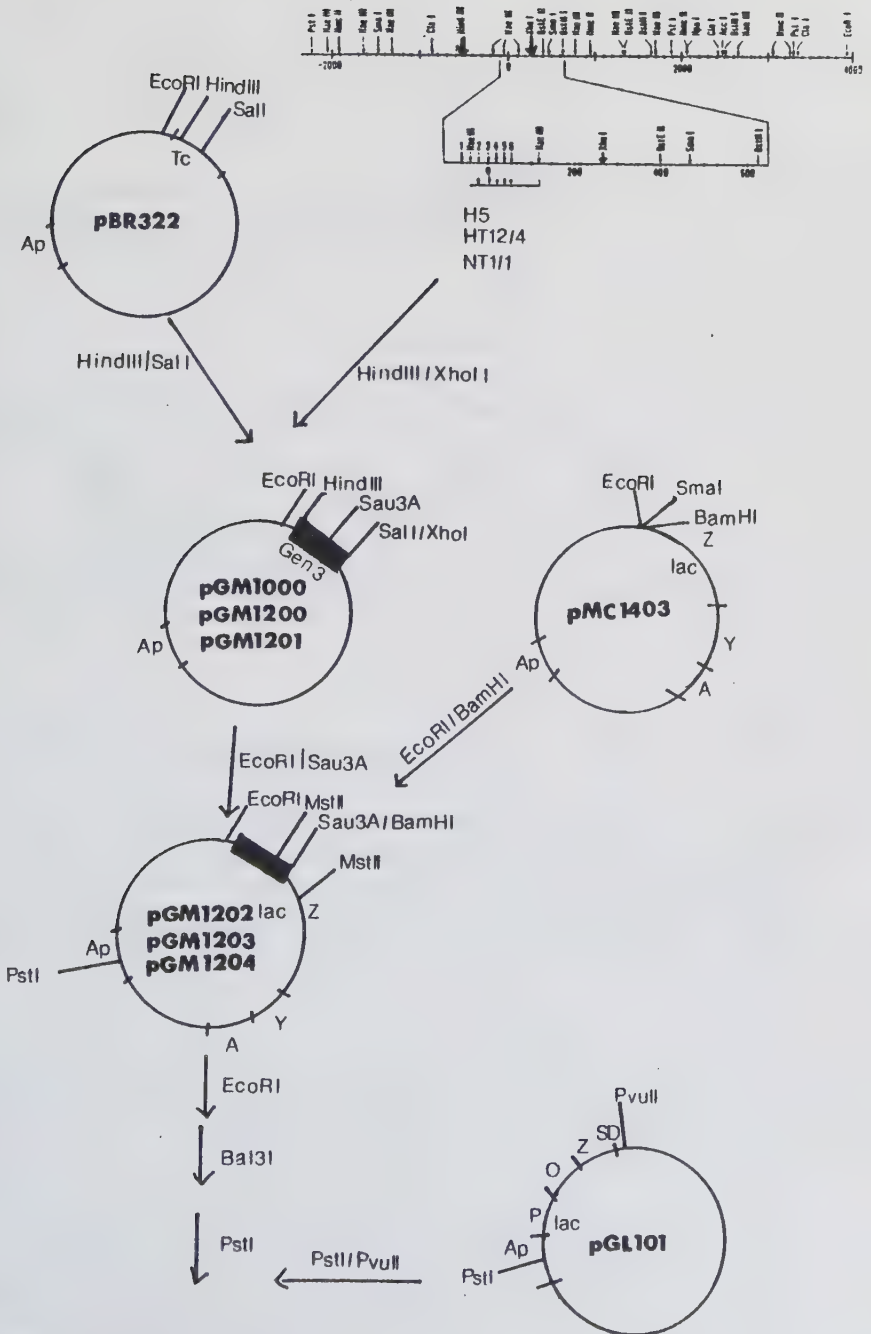


Abb.5a

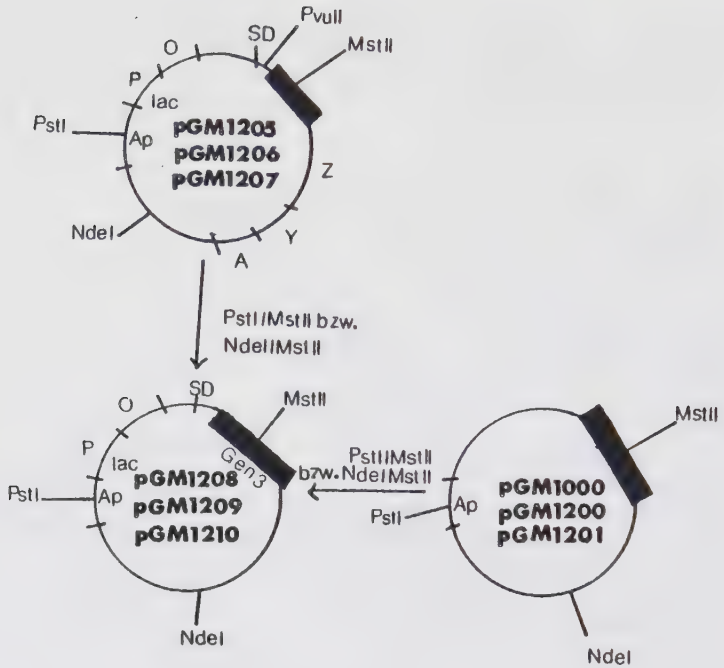


Abb.5b

Abb.5a,b: Klonierungstrategie für eine Steigerung der Expression des Genprodukts 3. Ein Ausschnitt aus der Restriktionskarte von P22 (Casjens u. Huang 1982), der das HindIII/XhoI-Fragment (Gen 3) enthält, ist eingezeichnet.

AluI AluI
MndIII

EcoRV

TaqI

WT

AGCTTGAGCTAATCAAATTCACTTCCAGTCAGGCGAGCAAAATTCGGATATCAGGACCCGACTATCGAAGCGGTCGG
10 20 30 40 50 60 70 80

MnlIB
TaqI

HpaII NlaIII AuaIIB
FnuDII
Sau96I

MboIIA
XmnI

AAATCGAGGGGAAGCGTTAGACCTGTTCACTACCGGAGCATGATGTGGTCCCGTAATCAATTTGGGTAAAGBAGAAGAAA
90 100 110 120 130 140 150 160

Fnu4HI HgaIB NlaIII HphIA MnlIB

HT

NT

CCCAATTACTCAAGAACTATACGAGCGGCTGGAAAGCGTCATTCATGATTACGATGGTGAATCAGTTTATGCGAGGC
170 180 190 200 210 220 230 240

TaqI

FnuDII DdeI
HhaI HinfI
MnlIB MnlIA

DdeI

TTGGCACACTCGAATTGCTAAAGCAGTCATTGATTGAGGGCGCGAAGAGTCCTCAGCCTGAAATAACAACCTAAGTGA
250 260 270 280 290 300 310 320

BanIA
Fnu4HI
NlaIV

HaeIII
MnlIB
Sau96I

NlaIII

HinfI
TaqI M

TGAATATGCGGCACCAAGGGCAACCGATTTTGGGAGGCCCGCAGTAGTCATGGGCGAAATCCTAAATCGAATCGC
330 340 350 360 370 380 390 400

HaeI HaeIIC
HhaI
MnlIB

BbvIB
Fnu4HI

TaqI

AluI

XmnI

CGAGGCGCTGTGGGCTGCTTGTGTGAATACTTCGAGTGGGTGGAAAGCTAACCCGCTATGGGAGATGAAGGCGTCTCG
410 420 430 440 450 460 470 480

3. Konstruktion eines geeigneten Vektors

3.1. Klonierung des Gens 3 in das Plasmid pBR322

Ein HindIII/XhoI-Fragment (850 Bp) der Phagenmutanten NT1/1 und HT12/4 wurde in den HindIII/SalI-Bereich des Tetracyclingens von pBR322 kloniert. Das klonierte DNS-Fragment trägt die genetische Information für das Protein gp3. Das Wildtyp-Gen 3 von P22 war bereits kloniert.

Die entstandenen rekombinierten Plasmide wurden pGM1000 (WT), pGM1200 (HT), pGM1201 (NT) genannt (Abb.5a).

Eine Inserierung in die HindIII-Stelle des Tetracyclingens führt häufig zur Zerstörung des Tetracyclinpromoters. Da das Gen 3 keinen eigenen Promoter hat, kann eine Expression des Genprodukts 3 nur bei einer Rekonstitution des Tetracyclinpromoters erfolgen.

3.2. Fusionierung des Gens 3 mit dem lacZ-Gen

Zahlreiche Arbeitsgruppen haben Vektoren für eine Fusionierung von Genen mit dem lacZ-Gen entwickelt (Guarente et al. 1980, Zabeau u. Stanley 1982, Casadaban et al. 1980, Casadaban et al. 1983, Weinstock et al. 1983, Shapira et al. 1983).

Da sich der Vektor pLG200/pLG400 von Guarente et al. 1980 bei mir auf Grund von Deletionen im Vektorbereich als instabil erwies, verwendete ich den Vektor pMC1403, der von Casadaban und Cohen (1980) entwickelt worden war (Abb.5a). Dem Vektor pMC1403 fehlen die lacZ-spezifischen Transkriptions- bzw. Translationssignale und die ersten 7 Codons der β -Galaktosidase. In das achte Codon des lacZ-Gens ist ein Polylinker inseriert, der eine EcoRI-, SmaI- und BamHI-Stelle enthält.

Der nächste Klonierungsschritt bestand darin, ein N-terminales Fragment des Gens 3 mit dem lacZ-Gen zu fusionieren. Auf Grund der bekannten DNS-Sequenz des Gens 3 (Backhaus 1985, Abb.6) war es einfach, geeignete Restriktionsstellen für eine Fusionierung mit dem lacZ-Gen im richtigen Leserahmen zu finden. Ich klonierte ein EcoRI/Sau3A-Fragment (782 Bp) von pGM1000 (WT), pGM1200 (HT), pGM1201 (NT) in den EcoRI/BamHI-Bereich von pMC1403 (Abb.5a). Nach Transformation des Ligationsansatzes in E. coli MC1061 wurde auf LB-Ap-Platten selektioniert. Aus Transduktionsdaten, die im Ergebnisteil (C.b) noch näher erläutert werden, wußte ich, daß das gp3- β -Galaktosidase-

Hybridprotein vom rekonstituierten Tetracyclinpromoter exprimiert wird. Um β -Galaktosidasepositive Klone nachzuweisen, wurde in die Mitte einer LB-AP-Platte ein Tropfen mit 0,5 mg X-Gal/5 μ l Dimethylformamid gesetzt und die erhaltenen Transformanten dann nach folgendem Muster sternförmig ausgestrichen (Abb.7).



Abb.7

Der Vorteil von LB-X-Gal Platten ist, daß auch β -Galaktosidaseaktivitäten von 1 Einheit nachgewiesen werden können (Weinstock et al. 1983). Aus jeweils 10 Kolonien mit blauer Färbung wurde die DNS isoliert und durch Restriktionspaltung mit MstII näher untersucht. MstII spaltet 1 x im Gen 3 (Pos. 400) und 1 x im LacZ-Gen (Pos. 235) (Abb. 5,6). Von jeweils 4 Klonen, bei denen das MstII Fragment (586 Bp) nachgewiesen werden konnte, wurde die β -Galaktosidaseaktivität nach Miller (1972) bestimmt und der Mittelwert ermittelt (Tab.1).

Bei den erhaltenen rekombinanten Plasmiden pGM1202, pGM1203 und pGM1204 (Abb.5a) erfolgt die Expression des Hybridproteins offenbar unter der Kontrolle des Tetracyclinpromoters.

3.3. Vorschalten eines lac-Promoterfragments zur Kontrolle der Expression des Gen 3-lacZ Hybridgens

Um die Expression des Gen 3-lacZ Hybridproteins zu steigern, war es wichtig, das Hybridprotein unter die Kontrolle eines starken Promoters zu stellen. Ein starker Promoter erlaubt eine optimale Transkription des Gens. Ebenso spielt der Abstand zwischen der SD-Sequenz des Promoterfragments und dem Startcodon des Gens eine Rolle bei der Expression des Hybridproteins. Ich versuchte, diese Kriterien bei der Konstruktion der folgenden rekombinierten Plasmide zu beachten.

Ziel des nächsten Klonierungsschritts sollte es sein, ein lac-Promoterfragment möglichst nahe an das Startcodon des Gens 3 zu bringen. Die Gen 3-lacZ-Fusionsklone pGM1202 (WT-lacZ), pGM1203 (HT-lacZ), pGM12204 (NT-lacZ) wurden deshalb mit EcoRI geöffnet und anschließend mit Bal 31 verdaut (Abb.5a). Nach der Inkubation mit Bal 31 schnitt ich mit PstI nach, entfernte dadurch den N-terminalen Teil des AP-Gens und klonierte ein PstI/PvuII-lac-Promoterfragment (850 Bp) aus pGL101 vor das verkürzte Hybridgen (Abb 5a,b). Das lac-Promoterfragment enthält den N-terminalen Teil des Ampicillings, den Promoter-Operator-Bereich des lac Operons, die SD-Sequenz des lacZ-Gens und weitere 5 Nukleotide. Da die PstI Schnittstelle im Ampicillingen liegt, erfolgte durch diese Klonierung eine Rekonstitution des Ampicillings. Nach Transformation des Ligationsansatzes in E. coli MC1061 wurde auf McConkey-Ap-Platten selektioniert. McConkey-Platten dienen zum Nachweis von Klonen, deren β -Galaktosidaseaktivität größer als 100 Einheiten ist (Weinstock et al. 1983). Die etwa 100 erhaltenen Transformanten sind hell-bis dunkelrot gefärbt. Jeweils 5 Kolonien bei den Mutanten bzw. 3 Kolonien beim Wildtyp waren dunkelrot gefärbt. Aus diesen Kolonien wurde die DNS isoliert und durch Restriktionsanalyse mit PstI/MstII näher untersucht. Die Größe des PstI/MstII-Fragments war für mich auch ein Maß für die Optimierung des Abstands zwischen lac-Promoterfragment und Startcodon des Gens 3. Anschließend wurde von jeweils 2 Klonen die β -Galaktosidaseaktivität nach Miller (1972) bestimmt. Von dem Fusionsklon des Wildtyp bzw. der Mutanten, der die höchste β -Galaktosidaseaktivität hatte, wurde der Übergang zwischen lac-Promoterfragment und Gen 3 durch Sequenzierung nach Sanger ermittelt. Die rekombinanten Plasmide werden mit pGM1205 (WT-lacZ), pGM1206 (HT-lacZ), pGM1207 (NT-lacZ) bezeichnet (Abb.5b).

Tabelle 1 zeigt eine Zusammenstellung der gemessenen β -Galaktosidaseaktivitäten und des durch Sequenzierung nach Sanger ermittelten Abstands zwischen SD-Sequenz des lacZ-Gens und Startcodon von Gen 3.

Tabelle 1: Zusammenstellung der gemessenen β -Galaktosidaseaktivitäten und des durch Sequenzierung nach Sanger optimierten Abstands zwischen SD-Sequenz des lac-Promoterfragments und dem Startcodon von Gen 3

Hybridplasmid	β -Gal.Akt. (Einheiten)	Hybridplasmid	β -Gal.Akt. (Einheiten)	Abstand SD des lac-Promoter-fragment-AUG von Gen 3 (Bp)	Steigerung d. β -Gal.Akt. Protein	Kodiertes
Expression: Tc Promoter	Expression:	lac-Promoter	Expression:	lac-Promoter		
pGM1202	11	pGM1205	810	296	74	WTgp3- β -Gal.
						Fusionsprot.
pGM1203	14	pGM1206	1200 ⁺ 50	144	86	HTgp3- β -Gal.
						Fusionsprot.
pGM1204	12	pGM1207	1250 ⁺ 50	112	104	NTgp3- β -Gal.
						Fusionsprot.

58

Für die Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität wurde der E. coli Stamm MC1061 verwendet.

Der Stamm MC1061 bzw. MC1061 mit dem Vektorplasmid pMC1403 besitzt keine β -Galaktosidaseaktivität.

Vergleicht man die in Tabelle 1 ermittelten β -Galaktosidase-aktivitäten, so kann man eine deutliche Steigerung der Expression des gp3- β -Galaktosidase-Fusionsproteins bei den rekombinierten Plasmiden pGM1205, pGM1206, pGM1207 gegenüber den Plasmiden pGM1202, pGM1203, pGM1204 erkennen. Bei dem rekombinierten Plasmid pGM1207 konnte die Expression des Hybridproteins im Vergleich zum Ausgangsplasmid pGM1204 um den Faktor 104 gesteigert werden.

Daß der Abstand zwischen SD-Sequenz des lacZ-Gens und dem Startcodon von Gen 3 auf nicht weniger als 112 Bp verkürzt werden konnte, liegt vielleicht an der geringen Eignung von Bal 31 für die Verkürzung dieses DNS-Abschnitts. Die DNS-Sequenz distal des Startcodons von Gen 3 bis zur EcoRI Stelle enthält 9 nah aufeinanderfolgende GC-Cluster innerhalb von 357 Bp (Abb.6), während die Sequenz des pBR322 Anteils AT-reicher ist. Bal 31 ist ein Enzym, das je nach Konzentration in beide Richtungen abbauen kann. Eine AT-reiche Sequenz wird dabei schneller abgedaut als eine Sequenz, die viele GC-Cluster enthält (Landick 1982). Bei der extrem langen Inkubationszeit von 30 min. wurde die DNS-Sequenz zur PstI Stelle im Ap Gen vermutlich schnell abgedaut bzw. diese überschritten, während das Enzym an den GC-Clustern im Gen 3 "hängenblieb". Eine Sequenzierung von der HinfIC-Stelle (Pos.290, Abb.6) bei den Mutanten bzw. von der EcoRV Stelle (Pos.49, Abb.6) beim Wildtyp in den Promoterbereich zeigte, daß der Übergang fast immer in einem GC-Cluster liegt (Abb.6). Vielleicht wäre eine Kombination aus Exonuklease III/VII bzw. Exonuklease III/S1 sinnvoller für eine Verkürzung des Abstands gewesen.

3.4. Entfernung des lacZ-Genanteils und Rekonstitution des Gens 3

Die β -Galaktosidaseaktivität erwies sich bei der Konstruktion meiner Gen 3-lacZ-Fusionsklone als ein vortreffliches Assaysystem, um Aussagen über eine Steigerung der Expression zu machen. Da die Fusionsproteine jedoch keinen funktionsfähigen gp3-Anteil besitzen (s.C.b.2) war für mich die Expression des unfusionierten Proteins gp3 wichtig. Dazu war es erforderlich, den β -Galaktosidaseanteil gegen den C-terminalen Teil des Gens 3 zu ersetzen. Deshalb klonierte ich das PstI/MstII-Fragment von pGM1206 bzw. pGM1207 in den

PstI/MstII-Bereich von pGM1200 bzw. pGM1201 (Abb.5a,b). Beim Wildtyp klonierte ich das MstII/NdeI-Fragment von pGM1205 in den MstII/NdeI-Bereich von pGM1000 (Abb.5a,b). Durch diese Klonierungen wurde der β -Galaktosidaseanteil entfernt und Gen 3 rekonstituiert. Der Ligationsansatz wurde in E. coli MC1061 transformiert. Die Transformanten wurden durch Restriktionsanalyse mit PstI/MstII (Mutanten) bzw. mit MstII/NdeI (Wildtyp) untersucht. Die neukonstruierten Hybridplasmide wurden als pGM1208 (WT), pGM1209 (HT), pGM1210 (NT) (Abb. 5b) bezeichnet. Da eine konstitutive Expression des Proteins gp3 vom lac-Promoter keine letale Wirkung für die Bakterienzellen hatte, verzichtete ich auf eine kontrollierte Expression des Genprodukts 3.

b) Untersuchung der biologischen Funktion des Genprodukts 3 von P22 und den P22 Mutanten NT1/1 und HT12/4

1. Allgemeine Beschreibung der Mutanten

1.1. NT-Mutanten

NT-Mutanten sind Mutanten, die durch eine Mutagenisierung von P22 mit N-methyl-N'-nitro-N-Nitrosoguanidin entstanden sind. Alle diese Mutanten zeichnen sich durch eine niedrige Transduktionshäufigkeit chromosomaler Marker aus (Schmieger 1971, 1972). Die Mutationsorte liegen in den Genen 1, 5, 8 und zwischen Gen 3 und Gen 19 (Raj et al. 1974, Abb.8). Eine dieser Mutanten ist die Mutante NT1/1, die ich in meiner Arbeit verwendet habe. Der Mutationsort liegt zwischen Gen 3 und Gen 19 (Abb.8). Diese Mutante soll eine höhere Spezifität für die pac-site als P22 haben und bevorzugt nur erste Headfuls verpacken (E. Jackson pers. Mitteilung).

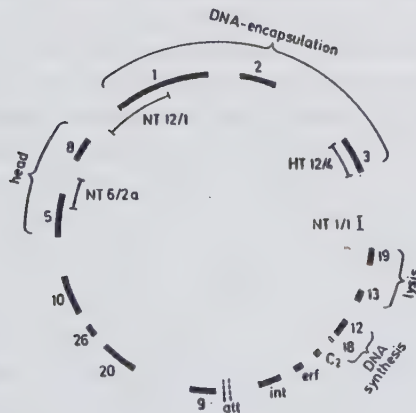


Abb.8: Mutationsorte der NT- und HT-Mutanten (Raj et al. 1974)

1.2 HT-Mutanten

HT-Mutanten entstanden, genau wie die vorher beschriebenen NT-Mutanten, durch eine Mutagenisierung von P22 mit NG. Diese Mutanten wurden von Schmieger isoliert (1972) und sind Mutanten im Gen 3. Alle HT-Mutanten zeigen eine, im Vergleich zum Wildtyp, erhöhte Transduktionshäufigkeit chromosomaler Marker (Schmieger 1972). Ein Lysat von HT-Phagen kann bis zu 50% transduzierende Partikel enthalten, während ein Lysat des P22-Wildtyps zu etwa 2-5% aus transduzierenden Phagen besteht (Susskind u. Botstein 1978, Schmieger 1972).

Man unterscheidet 2 Klassen von HT-Mutanten. Die erste Klasse startet die Verpackung der Phagen-DNS ähnlich wie der WT, an der pac-site. Dazu gehören die Mutanten HT13/4 und HT104/2 (Jackson et al. 1982).

Die zweite Klasse erkennt die Wildtyp-pac-site nicht, sondern startet die Verpackung der Phagen-DNS an anderen Stellen auf dem Phagengenom. Die Mutante HT12/4, die ich in meiner Arbeit verwendet habe, gehört zu dieser Klasse. Im Gegensatz zu den NT-Mutanten konnten die Mutationen einiger HT-Mutanten durch DNS-Sequenzierung genau kartiert werden.

Die DNS-Sequenz des Gens 3 der Mutante HT12/4 unterscheidet sich von der Wildtypsequenz nur im Austausch der Base Guanin gegen Adenin (Pos.570, Abb.6). Durch diesen Basenaustausch wird die Aminosäure Glutaminsäure gegen Lysin ersetzt.

2. Untersuchung der Transduktion verschiedener rekombinierter Plasmide

Orbach u. Jackson (1982) konnten zeigen, daß der Salmonella - Phage P22 in der Lage ist, das Plasmid pBR322 mit hoher Effizienz zu transduzieren, wenn es Inserts von P22 bzw. zu P22 homologer DNS enthielt. Sie erklärten ihre Resultate mit der nach Phageninfektion stattfindenden Rekombination zwischen Phagen-DNS und dem Insert des Hybridplasmids. Diese Rekombination wird entweder durch das phageneigene Rekombinationssystem (erf) oder das zelluläre Rekombinationssystem (recA) ermöglicht. Auf diese Weise erhält man Transduktanten, auch wenn die rekombinierten Plasmide kein echtes pac-Signal tragen. Schmidt u. Schmieger (1984) konnten die Beobachtungen von Orbach u. Jackson bestätigen. Um diejenigen Hybridplasmide, die ein pac-Signal tragen, selektieren zu können, führten sie ihre Plasmidtransduktionen unter erf⁻ rec⁻-Bedingungen durch. Dazu wurde der Phage erf^{c2} auf dem Stamm 4412rec⁻ mit dem jeweiligen Hybridplasmid vermehrt und die Transduktion wie in Material u. Methoden beschrieben durchgeführt. Da unter rec⁻ erf⁻-Bedingungen jede Art von Rekombination verhindert wird, kann der Phage erf^{c2} das Hybridplasmid nur dann transduzieren, wenn es ein pac-Signal trägt. Obwohl sich der Bakteriophage auf Grund der Defekte in beiden Rekombinationssystemen nur sehr schlecht vermehren kann, werden die späten Phagenproteine exprimiert, so daß eine DNS-Verpackung möglich ist. Um jede Rekombination zwischen Phagen-DNS und Insert des rekombinanten Plasmids zu vermeiden, führte ich deshalb alle Transduktionen ebenfalls unter erf⁻ rec⁻-Bedingungen durch. Der Phage erf^{am3}, mit dem ich zahlreiche Transduktionsexperimente durchführte, kann keine Rekombination durchführen und bildet auf Grund einer Amber-mutation in Gen 3 kein funktionsfähiges Genprodukt 3. Eine Plasmidtransduktion mit diesem Phagen ist nur dann möglich, wenn das Protein gp3 vom jeweiligen Hybridplasmid exprimiert wird und ein pac-Signal innerhalb des klonierten DNS-Fragments erkennt. Ziel der Plasmidtransduktionen mit diesem Phagen sollte es sein, herauszufinden, ob ein funktionsfähiges Genprodukt 3 von den Hybridplasmiden exprimiert werden kann.

Vergleicht man die T/P-Werte der Transduktion der rekombinierten Plasmide pGM1000 (WT), pGM1200 (HT) und pGM1201 (NT) (Tab. 2, Abb.5a) durch den Phagen erfam3, so findet man eine gute Transduktion der Plasmide pGM1000 und pGM1201. Das Plasmid pGM1200 wird vom Phagen erfam3 weniger häufig transduziert. Die nicht nachweisbare Transduktion von pBR322 ist nicht verwunderlich, da dieses Plasmid kein pac-Signal trägt und als Kontrolle dient.

Diese Resultate zeigen, daß das Genprodukt 3 vom klonierten HindIII/XhoI-Fragment des Wildtyps bzw. der Mutanten exprimiert wird. Nach Expression vom jeweiligen Hybridplasmid kann das Protein gp3 das pac-Signal innerhalb dieses DNS-Fragments erkennen und zusammen mit dem Protein gp2, das vom Phagen gebildet wird, die Verpackung der Plasmid-DNS durchführen. Die im Vergleich zu den Plasmiden pGM1000 und pGM1201 geringere Transduktion des Hybridplasmiids pGM1200 kann man dadurch erklären, daß das vom rekombinanten Plasmid pGM1200 exprimierte Protein gp3 der Mutante HT12/4 seine eigene pac-site nicht erkennt und andere Regionen auf dem Hybridplasmid als pac-site analog identifiziert. Tabelle 3 zeigt eine Zusammenstellung der Transduktionen der rekombinierten Plasmide, bei denen das Genprodukt 3 unter der Kontrolle des lac-Promoters exprimiert wird. Vergleicht man die T/P-Werte der neukonstruierten Plasmide pGM1208 (WT), pGM1209 (HT), pGM1210 (NT) (Tab. 3, Abb.5b) mit den T/P-Werten der Plasmide pGM1000, pGM1200, pGM1201 (Tab. 2), so findet man höhere Transduktionsraten bei einer Expression des Proteins gp3 unter dem lac-Promoter. Die etwa gleich hohen Transduktionsraten bei allen Plasmiden (pGM1208, pGM1209, pGM1210) bestätigen, daß unter der Kontrolle des lac-Promoters eine größere Menge an Genprodukt 3 exprimiert wird. Daß das Plasmid pGM1209 (HT) so gut transduziert werden kann, war etwas Überraschend, da das Genprodukt 3 der Mutante HT12/4 keine Spezifität für seine eigene pac-site hat. Aus einem Vergleich mit den Transduktionsexperimenten, die in Tab. 2 dargestellt sind, kann man daher schließen, daß die gebildete Menge an Protein gp3 der limitierende Faktor bei den Plasmidtransduktionen ist. Eine erhöhte Expression des Genprodukts 3 der Mutante HT12/4 führt trotz fehlender Erkennung für die pac-site zu einer erhöhten Transduktion des Hybridplasmiids pGM1209.

Betrachtet man die T/P-Werte, die man bei der Transduktion der Gen 3-lacZ-Fusionsklone (pGM1202, pGM1203, pGM1204, Abb.5a) durch den Phagen erfam3 erhält, so liegt bei allen rekombinierten Plasmiden und beim Kontrollplasmid pMC1403 die Transduktionsrate unter der Nachweisgrenze (Tab. 4). Durch die Fusionierung des Gens 3 mit dem lacZ-Gen kann offensichtlich kein Hybridprotein mit funktionsfähigem gp3-Anteil gebildet werden. Da auch der Phage kein intaktes Protein gp3 liefern kann, sind die geringen T/P-Werte nicht verwunderlich. Diese Fusionsklone eignen sich aber vortrefflich für eine nähere Untersuchung des pac-Signals und des Genprodukts 3 der Mutante HT12/4. Die Mutante HT12/4 war für mich von Interesse, da sie eine Mutante im Gen 3 ist und die DNS-Verpackung nicht an der pac-Stelle des Wildtyps startet. Sie erkennt andere Stellen auf dem Phagengenom bzw. dem Chromosom als pac-sites (Jackson et al. 1982). Um herauszufinden, ob eine Veränderung des pac-Signals dieser Mutante die Ursache dafür ist, führte ich die in Tab. 4 aufgeführten Transduktionsexperimente mit dem Phagen erfc2 durch. Der Phage erfc2 bildet ein funktionsfähiges Genprodukt 3. Die Gen 3-lacZ-Fusionsklone (pGM1202, pGM1203, pGM1204) werden durch diesen Phagen sehr gut transduziert (Tab. 4). Diese Transduktionen zeigen, daß das Genprodukt 3 des Wildtyps sowohl seine eigene pac-site als auch die pac-Stellen der Mutanten HT12/4 und NT1/1 etwa gleich gut erkennt. Das bedeutet, daß die pac-site bei diesen Mutanten von der Mutation offenbar nicht betroffen ist. Das Vektorplasmid pMC1403, das ich für eine Fusionierung des Gens 3 mit dem lacZ-Gen verwendet habe, wird mit nicht nachweisbarer Häufigkeit transduziert, da es kein pac-Signal trägt. Da das pac-Signal der Mutante HT12/4 nicht verändert ist, hielt ich es für sinnvoll, durch Transduktionsexperimente mit denselben Hybridplasmiden das Genprodukt 3 dieser Mutante zu untersuchen (Tab. 4). Ich führte die Transduktionen mit dem Phagen erf3HT durch. Dieser Phage exprimiert nicht das Genprodukt 3 des Wildtyps, sondern bildet das Protein gp3 der Mutante HT12/4. Bei der Transduktion der Hybridplasmide pGM1202, pGM1203, pGM1204 und des Vektorplasmids pMC1403 durch den Phagen erf3HT findet man kaum Unterschiede in den T/P-Verhältnissen. Das Genprodukt 3 der Mutante HT12/4, das vom Phagen erf3HT gebildet wird, kann die angebotenen pac-sites nicht erkennen und identifiziert offenbar Sequenzen auf den

Hybridplasmiden bzw. dem Kontrollplasmid pMC1403 als pac-sites. Das Protein gp3 der Mutante HT12/4 unterscheidet sich vom Genprodukt 3 des Wildtyps nur im Austausch der Aminosäure Glutaminsäure gegen Lysin (Pos.570, Abb.6). Dieser Austausch scheint zu einer so enormen Konformationsveränderung des Proteins gp3 zu führen, daß es seine eigene pac-site nicht mehr spezifisch erkennt, sondern auch Sequenzen auf dem Kontrollplasmid pMC1403 als pac-site analog identifiziert. Die insgesamt etwas geringere Transduktion der Gen 3-lacZ-Fusionsklone durch den Phagen erf3HT im Vergleich zum Phagen erf2 war jedoch etwas verwunderlich. Eine Erklärungsmöglichkeit dafür ist der niedrigere Titer des erf3HT Lysats. Dadurch erhält man geringere T/P-Werte.

Tabelle 2: Zusammenstellung der T/P-Werte (Verhältnis von Transduktanten zu infektiösen Phagenpartikeln), die man bei der Transduktion verschiedener Hybridplasmide durch den Phagen erfam3 erhält.

Bakterienstamm	Phage erfam3
4412rec ₋ pGM1000	$7,7 \times 10^{-5}$
4412rec ₋ pGM1200	$5,7 \times 10^{-6}$
4412rec ₋ pGM1201	$1,0 \times 10^{-4}$
4412rec ₋ pBR322	$< 10^{-8}$

Tabelle 3: Zusammenstellung der T/P-Werte, die man bei der Transduktion verschiedener Hybridplasmide durch den Phagen erfam3 erhält.

Bakterienstamm	Phage erfam3
4412rec ₋ pGM1208	$1,2 \times 10^{-2}$
4412rec ₋ pGM1209	$1,0 \times 10^{-2}$
4412rec ₋ pGM1210	$6,5 \times 10^{-3}$
4412rec ₋ pBR322	$< 10^{-8}$

Tabelle 4: Zusammenstellung der T/P-Werte, die man bei der Transduktion verschiedener Hybridplasmide durch die Phagen erfam3,erfc2 und erf3HT erhält.

Bakterienstamm	Phagen erfam3	erfc2	erf3HT
4412rec ₋ pGM1202	$< 10^{-8}$	$4,7 \times 10^{-3}$	$1,9 \times 10^{-4}$
4412rec ₋ pGM1203	$< 10^{-8}$	$2,1 \times 10^{-3}$	$2,1 \times 10^{-4}$
4412rec ₋ pGM1204	$< 10^{-8}$	$2,2 \times 10^{-3}$	$2,0 \times 10^{-4}$
4412rec ₋ pMC1403	$< 10^{-8}$	$< 10^{-8}$	$3,6 \times 10^{-5}$

3. Untersuchung der Transduktion verschiedener chromosomaler Marker

3.1 Transduktion chromosomaler Marker durch die Phagen P22H5, NT1/1, HT12/4

Ich hielt es für sinnvoll die Transduktion chromosomaler Marker durch die Phagen P22H5, NT1/1 und HT12/4 zu untersuchen, um diese T/P-Werte mit den T/P-Werten, die man bei der Expression des Genprodukts 3 von Hybridplasmiden erhält, vergleichen zu können (s.C.b.3.2).

Tabelle 5 zeigt eine Zusammenstellung der Transduktion verschiedener chromosomaler Marker. Wie daraus ersichtlich ist, zeigt der Phage P22H5 eine hohe Transduktion des Gens HisB22 und eine im Vergleich dazu etwas geringere Transduktion der Gene LeuA124 und ProA2. Beim Phagen HT12/4 kann man eine im Vergleich zum Wildtyp höhere Transduktion der Gene ProA2 und LeuA124 erkennen. Das Gen HisB22 wird durch diesen Phagen häufiger transduziert als durch P22H5. Der Phage NT1/1 zeichnet sich durch eine generell niedrige Transduktion chromosomaler Marker aus, wie es auf Grund seiner Mutanteneigenschaft (NT=niedrigere Transduktionshäufigkeit) zu erwarten ist (Schmieger 1971,1972).

3.2 Transduktion chromosomaler Marker bei der Expression des Genprodukt 3 von rekombinierten Plasmiden

Neben der Transduktion verschiedener chromosomaler Marker durch die Phagen P22, NT1/1 und HT12/4 war es naheliegend zu untersuchen, ob es Unterschiede in der Transduktion dieser Marker gibt, wenn das Genprodukt 3 statt vom Phagen vom jeweiligen Hybridplasmid bereitgestellt wird. Aus Gründen, die schon erwähnt wurden, war es unbedingt notwendig, die Experimente unter erf⁻ rec⁻-Bedingungen durchzuführen. Bei den in Tab. 6 und Tab. 7 dargestellten Experimenten wurde der Salmonella -Stamm 4412rec⁻ mit dem jeweiligen Hybridplasmid mit dem Phagen erfam3 infiziert. Da der Phage auf Grund der Ambermutation im Gen 3 kein funktionsfähiges Protein gp3 bilden kann, wird das Genprodukt 3 nur vom rekombinanten Plasmid exprimiert. Mit dem Phagenlysate wurden dann Empfängerstämme infiziert, die mit P22 lysogenisiert waren und Defekte in den Genen der geprüften Aminosäuremarker aufwiesen. Vergleicht man die T/P-Werte bei der Transduktion des Gens

HisB22, wenn das Genprodukt 3 von den rekombinierten Plasmiden pGM1000, pGM1200, pGM1201 gebildet wird, so findet man annähernd gleiche Transduktionsraten (Tab. 6). Das vom Hybridplasmid pGM1200 gebildete Genprodukt 3 wird im weiteren Text als Protein HTgp3, das vom Plasmid pGM1201 exprimierte Protein gp3 als Protein NTgp3 bezeichnet. Die gute Transduktion des Gens HisB22 bei einer Expression des Proteins NTgp3 vom Hybridplasmid pGM1201 bestätigt, daß der eigentliche Mutationsort der Mutante NT1/1 außerhalb des Gens 3 kartiert ist. Die DNS-Sequenz des HindIII/XhoI-Fragments der Mutante NT1/1 ist bisher nicht ermittelt worden. Sie scheint jedoch keine für die biologische Aktivität des Proteins NTgp3 wesentliche Änderung zur Wildtypsequenz zu haben. Durch den Phagen NT1/1 hingegen werden chromosomale Marker generell niedrig transduziert (Tab.5). Neben der Erkennung der pac-site scheinen noch andere Faktoren von Bedeutung zu sein für die Verpackung phageneigener bzw. bakterieller DNS. Auch die NT-Mutanten NT12/1 und NT6/2, die eine Mutation im Gen 1 bzw. Gen 5 aufweisen, zeichnen sich durch eine verminderte Transduktion chromosomaler Marker aus. Betrachtet man die Transduktion des Gens ProA2 (Tab. 6), so findet man eine geringe Transduktion dieses Gens bei einer Expression des Genprodukts 3 von den rekombinierten Plasmiden pGM1000 (WT) und pGM1201 (NTgp3), eine hohe Transduktion jedoch, wenn das Protein gp3 vom Hybridplasmid pGM1200 (HTgp3) gebildet wird. Das Gen LeuA124 wird generell häufig transduziert, unabhängig von welchem Hybridplasmid (pGM1000, pGM1200, pGM1201) das Protein gp3 bereitgestellt wird. Aus den T/P-Werten, die in Tab. 6 zusammengestellt sind, kann man erkennen, daß man bei einer Expression des Proteins gp3 von den Plasmiden pGM1000 (WT) und pGM1201 (NTgp3) eine ähnliche Transduktion von chromosomalen Markern findet. Die bakteriellen Marker HisB22 und Leu124 werden häufig, der Marker ProA2 gering transduziert. Im Vergleich zur Expression des Proteins NTgp3 (Plasmid bzw. Phage), erhält man bei der Mutante HT12/4 eine generell häufige Transduktion chromosomaler Marker, unabhängig davon, ob das Protein HTgp3 vom Phagen oder vom Plasmid gebildet wird (Tab. 5,6). In Tabelle 7 sind die T/P-Werte zusammengestellt, die man bei der Transduktion des Gens ProA2 erhält, wenn das Genprodukt 3 unter der Kontrolle des lac-Promoters exprimiert wird (pGM1208,

pGM1209, pGM1210, Abb.5b). Diese T/P-Werte sind deutlich höher als die T/P-Werte, die man bei der Transduktion des Gens ProA2 erhält, wenn das Genprodukt 3 von den Plasmiden pGM1000, pGM1200, pGM1201 gebildet wird (Tab. 6,7). Die höheren T/P-Werte in Tab. 7 sind auf eine gesteigerte Expression des Proteins gp3 unter dem lac-Promoter (pGM1208, pGM1209, pGM1210) gegenüber dem Tetracyclinpromoter (pGM1000, pGM1200, pGM1201) zurückzuführen.

Tabelle 5: Zusammenstellung der T/P-Werte, die man bei der Transduktion verschiedener chromosomaler Marker durch die Phagen H5, HT12/4 und NT1/1 erhält.

Phage	Bakterielles Gen		
	ProA2	HisB22	LeuA124
H5	$2,7 \times 10^{-7}$	2×10^{-6}	$4,3 \times 10^{-7}$
HT12/4	$9,4 \times 10^{-5}$	8×10^{-6}	$5,3 \times 10^{-4}$
NT1/1	$6,2 \times 10^{-8}$	2×10^{-8}	$1,0 \times 10^{-8}$

Tabelle 6: Zusammenstellung der T/P-Werte, die man bei der Transduktion verschiedener chromosomaler Marker erhält, wenn das Genprodukt 3 von Hybridplasmiden gebildet wird. Auf dem Bakterienstamm 4412rec⁻ mit dem jeweiligen rekombinierten Plasmid wurde der Phage erfam3 gezogen. Als Empfängerstämme für die Transduktion dienten die Stämme His (sie), HS1140 (P22) und HS1022 (P22).

Bakterienstamm	Bakterielles Gen		
	ProA2	HisB22	LeuA124
4412rec ⁻ pGM1000	1×10^{-7}	$2,6 \times 10^{-6}$	$7,7 \times 10^{-5}$
4412rec ⁻ pGM1200	5×10^{-5}	$5,0 \times 10^{-6}$	$6,8 \times 10^{-5}$
4412rec ⁻ pGM1201	2×10^{-7}	$1,5 \times 10^{-6}$	$9,2 \times 10^{-5}$
4412rec ⁻ pBR322	$< 10^{-8}$	$< 10^{-8}$	$< 10^{-8}$

Tabelle 7: Zusammenstellung der T/P-Werte, die man bei der Transduktion des Gens ProA2 erhält, wenn das Genprodukt 3 von verschiedenen Hybridplasmiden gebildet wird. Im Gegensatz zu den in Tabelle 6 aufgeführten Plasmiden, erfolgt bei den Hybridplasmiden pGM1208, pGM1209, pGM1210 die Expression des Genprodukts 3 vom lac-Promoter aus.

Bakterienstamm	Bakterielles Gen	
	ProA2	
4412rec ⁻ pGM1208	$4,7 \times 10^{-4}$	
4412rec ⁻ pGM1209	$7,3 \times 10^{-3}$	
4412rec ⁻ pGM1210	$3,9 \times 10^{-4}$	
4412rec ⁻ pBR322	$< 10^{-8}$	

c) Identifizierung des Proteins gp3 mit dem Minizellsystem von E. coli

Das Minizellsystem von E. coli ist eine geeignete Methode für die Identifizierung von plasmidkodierten Genprodukten. Minizellen entstehen durch eine abnormale Zellteilung, die während der logarithmischen Wachstumsphase an einem oder beiden Polen der Bakterienzelle stattfindet (Adler et al. 1967). Im Vergleich zu normalen Zellen besitzen sie nur 1/10 der Größe, sind nicht teilungsfähig und enthalten keine chromosomale DNS. In den Minizellen findet man jedoch zu 95% reine Plasmid-DNS und häufig stabile zelluläre RNS (Levy 1971, Levy 1975). Das Minizellsystem eignet sich jedoch nur für eine Proteinanalyse von kleinen Hybridplasmiden (<10 MD). Nur diese Hybridplasmide segregieren während der abnormalen Zellteilung in die entstehende Minizelle (Levy 1970). Voraussetzung für eine gute Identifizierung von plasmidkodierten Genprodukten, ohne Verunreinigung durch chromosomal gebildete Proteine, ist eine Über zwei bis drei Sucrosegradienten gut gereinigte Minizellfraktion.

Um das Protein gp3 zu identifizieren, wurden die entsprechenden rekombinierten Plasmide in den minizellproduzierenden Stamm P678-54 transformiert. In Tabelle 8 sind die verwendeten Hybridplasmide zusammengestellt. Nach einer Reinigung der Minizellen über Sucrosegradienten, werden die plasmidkodierten Proteine mit ³⁵S-Methionin markiert und durch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt.

Vergleicht man das Proteinmuster des Vektors pBR322 (Abb.9a) mit dem der anderen Hybridplasmide (Abb.9b-9g), so fallen bei allen Proteinauftrennungen die gut exprimierte β -Laktamase (29 KD) und das Vorläuferprotein dieses Resistenzproteins (31,5 KD) auf. Zusätzlich zu diesen Resistenzproteinen kann man bei Abb.9b,9c ein Protein mit einem Molekulargewicht von 17.800 D erkennen, dessen Expression in Abb.9c gesteigert ist. Dieses Protein ist nicht vektorspezifisch und könnte deshalb auch auf Grund seines Molekulargewichts dem Genprodukt 3 entsprechen. Die schwache Expression dieses Proteins in Abb.9b ist auf die Kontrolle des Gens durch den Tetracyclinpromoter zurückzuführen. Unter dem lac-Promoter wird die Expression des Proteins deutlich gesteigert (Abb.9c). Aus Abbildung 9d,9f ist die schwache Expression des Proteins, das dem Protein NTgp3

bzw. HTgp3 (pGM1201, pGM1200) entsprechen könnte, ersichtlich. Abbildung 9e,9g zeigt die erhöhte Expression des vermutlichen Proteins NTgp3 bzw. HTgp3 (pGM1210, pGM1209) unter der Kontrolle des lac-Promoters.

Mit Hilfe eines LKB Ultro Scan Laser Densitometers kann die Steigerung der Expression des Genprodukts 3 durch die neukonstruierten Klone besser quantifiziert werden.

Abb.10 zeigt eine Zusammenstellung der Densitogramme, die mit den gleichen Buchstaben wie die entsprechenden Proteinauftrennungen in Abb.9 bezeichnet wurden. Die Position des vermutlichen Proteins gp3 wurde durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Bei einem Vergleich der Densitogramme 10b und 10c kann man sehen, daß die Expression des vermutlichem Genprodukts 3 des Wildtyps um den Faktor 4,7 gesteigert werden konnte. Im Vergleich zum Protein gp3 von P22 konnte die Expression des Proteins, das dem Protein NTgp3 (Densitogramm 10d,10e) entsprechen könnte, um den Faktor 6,5, die des vermutlichen Proteins HTgp3 (Densitogramm 10f,10g) um den Faktor 6 gesteigert werden.

Daß die Expression des Proteins gp3 nur bis zu einem Faktor von 6,5 gesteigert werden konnte, war etwas Überraschend, wenn man die deutliche Steigerung der Gen 3-lacZ-Fusionsklone unter dem lac-Promoter berücksichtigt. Durch den lac-Promoter konnte die β -Galaktosidaseaktivität des gp3- β -Galaktosidase-Fusionsproteins bis zu einem Faktor von 104 im Vergleich zum Tetracyclinpromoter gesteigert werden. (C.a.3.3).

Eine Erklärungsmöglichkeit, die äußerst reizvoll ist, wäre die Möglichkeit einer Autoregulation des Proteins gp3. Da das Genprodukt 3 an einen Bereich innerhalb seines eigenen Gens bindet, könnte dieses Protein seine eigene Expression regulieren.



Abb.9: Auftrennung von Proteinen, die von verschiedenen Hybridplasmiden im E. coli Minizellsystem exprimiert wurden.

Zur Identifizierung der plasmidspezifischen Proteine wurden von verschiedenen Stämmen Minizellen isoliert und mit ³⁵S-Methionin markiert. Die markierten Proteine wurden dann durch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt.

1: Molekulargewichtstandards

a: P678-54pBR322

b: P678-54pGM1000

c: P678-54pGM1208

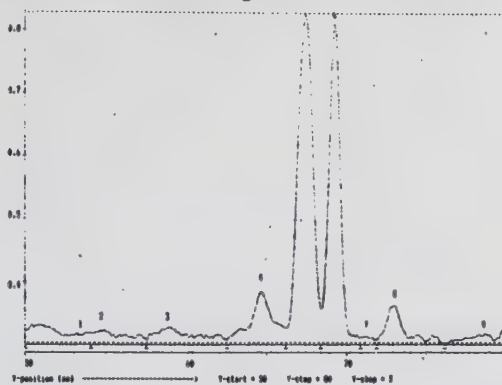
d: P678-54pGM1201

e: P678-54pGM1210

f: P678-54pGM1200

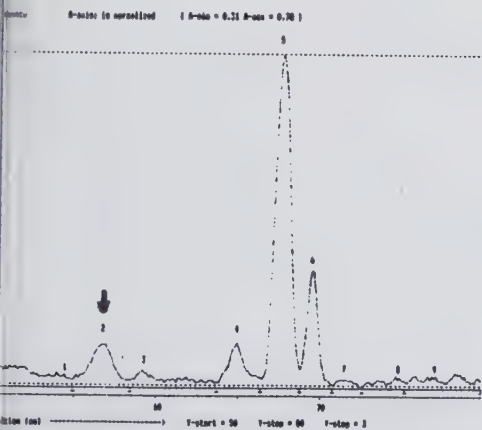
g: P678-54pGM1209

Abb.10: Zusammenstellung der Densitogramme, die den Proteinauf-trennungen in Abb.9 zugeordnet sind. Die Position des Genprodukts 3 ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.



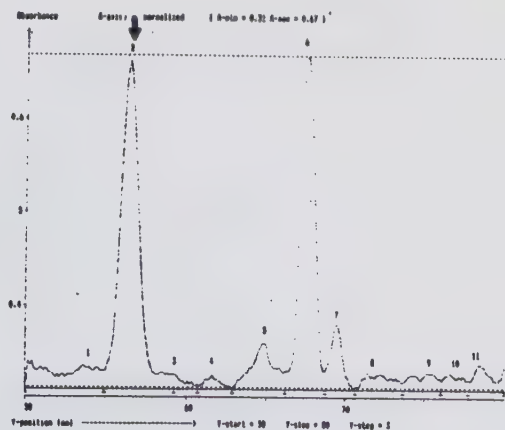
PEAK	POSITION	HEIGHT	AREA	REL. AREA	PEAK	POSITION	HEIGHT	AREA	REL. AREA
1	mm	AU	AU/mm	%	6	mm	AU	AU/mm	%
1	33.3	0.01	0.08	5.3	6	69.2	0.31	0.42	29.9
2	34.8	0.02	0.04	3.1	7	71.1	0.01	0.01	0.6
3	36.6	0.02	0.07	4.8	8	72.9	0.06	0.08	5.4
4	44.6	0.08	0.12	8.2	9	78.7	0.01	0.04	2.9
5	67.4	0.52	0.37	26.7					

a: pBR322



PEAK	POSITION	HEIGHT	AREA	REL. AREA	PEAK	POSITION	HEIGHT	AREA	REL. AREA
1	mm	AU	AU/mm	%	6	mm	AU	AU/mm	%
1	34.3	0.01	0.08	7.7	6	69.4	0.17	0.14	13.2
2	35.8	0.06	0.10	9.6	7	71.3	0.01	0.01	1.0
3	39.2	0.02	0.03	2.7	8	74.7	0.01	0.02	1.7
4	41.9	0.06	0.07	7.1	9	77.0	0.01	0.05	5.0
5	67.5	0.57	0.52	40.8					

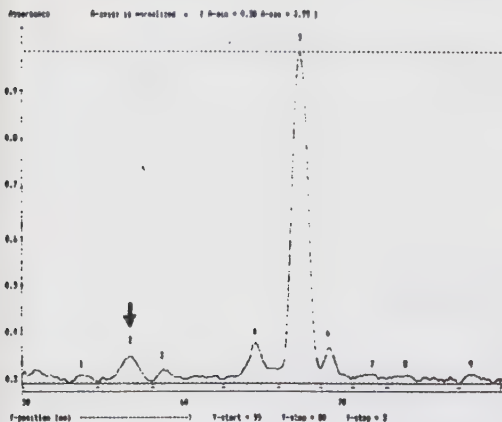
b: pGM1000



PEAK	POSITION	HEIGHT	AREA	REL. AREA	PEAK	POSITION	HEIGHT	AREA	REL. AREA
1	mm	AU	AU/mm	%	6	mm	AU	AU/mm	%
1	34.0	0.02	0.09	7.2	7	69.4	0.07	0.06	4.2
2	36.9	0.39	0.47	30.3	8	71.0	0.01	0.03	2.1
3	39.2	0.01	0.01	0.8	9	73.3	0.02	0.03	2.1
4	41.6	0.01	0.01	1.0	10	77.1	0.01	0.02	1.4
5	44.9	0.09	0.08	6.3	11	78.4	0.02	0.04	2.8
6	47.5	0.15	0.39	31.6					

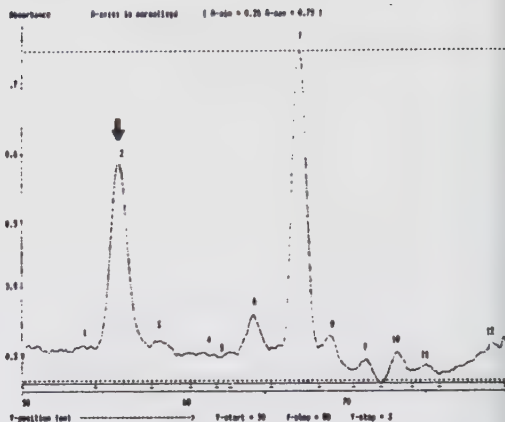
c: pGM1208

d:PGM1201



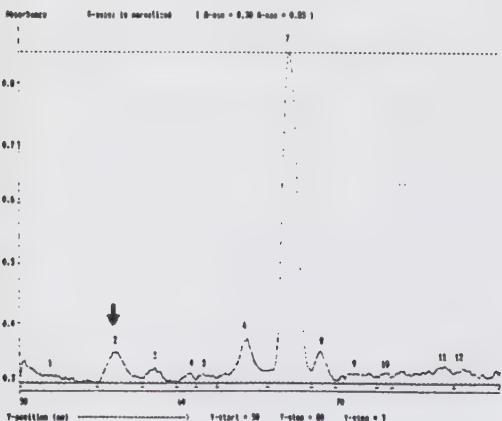
PEAK	POSITION	HEIGHT	AREA	REL. AREA	PEAK	POSITION	HEIGHT	AREA	REL. AREA
#	min	AU	AU/min	%	#	min	AU	AU/min	%
1	53.7	0.02	0.07	3.1	6	69.3	0.07	0.08	3.0
2	56.7	0.04	0.08	6.4	7	72.0	0.02	0.03	2.2
3	58.7	0.02	0.04	4.7	8	74.1	0.02	0.05	3.5
4	64.0	0.08	0.12	9.4	9	78.1	0.02	0.03	2.1
5	67.4	0.06	0.09	6.5					

e:PGM1210



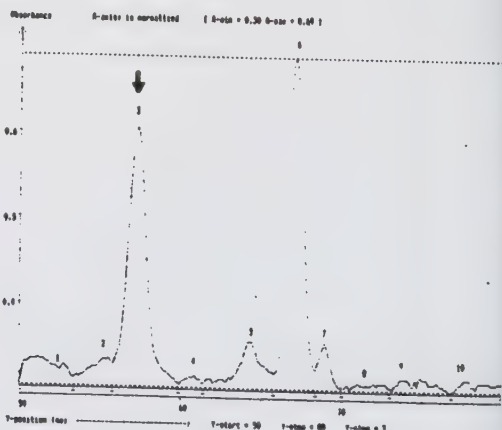
PEAK	POSITION	HEIGHT	AREA	REL. AREA	PEAK	POSITION	HEIGHT	AREA	REL. AREA
#	min	AU	AU/min	%	#	min	AU	AU/min	%
1	57.8	0.05	0.22	10.6	7	67.2	0.50	0.61	29.1
2	58.1	0.52	0.72	24.8	8	69.1	0.07	0.10	4.6
3	58.5	0.04	0.12	5.9	9	71.2	0.03	0.02	1.1
4	61.6	0.04	0.07	3.2	10	73.2	0.04	0.04	2.1
5	62.2	0.04	0.04	1.8	11	75.0	0.02	0.03	1.5
6	64.3	0.10	0.17	8.0	12	79.2	0.04	0.14	6.6

f:PGM1200



PEAK	POSITION	HEIGHT	AREA	REL. AREA	PEAK	POSITION	HEIGHT	AREA	REL. AREA
#	min	AU	AU/min	%	#	min	AU	AU/min	%
1	51.8	0.01	0.05	4.8	7	66.9	0.55	0.61	35.0
2	56.0	0.05	0.07	6.4	8	68.8	0.05	0.05	4.3
3	58.4	0.02	0.03	2.4	9	71.0	0.01	0.03	2.9
4	60.7	0.01	0.01	1.0	10	73.9	0.02	0.01	1.3
5	61.3	0.01	0.02	1.4	11	76.3	0.03	0.06	6.0
6	64.2	0.07	0.10	9.0	12	77.7	0.02	0.05	4.6

g:PGM1209



PEAK	POSITION	HEIGHT	AREA	REL. AREA	PEAK	POSITION	HEIGHT	AREA	REL. AREA
#	min	AU	AU/min	%	#	min	AU	AU/min	%
1	52.9	0.02	0.08	6.4	6	67.0	0.28	0.46	26.7
2	55.2	0.03	0.09	4.2	7	69.0	0.05	0.08	7.4
3	57.2	0.20	0.42	22.2	8	71.9	0.01	0.01	1.1
4	60.8	0.01	0.01	1.2	9	73.9	0.01	0.03	2.8
5	64.7	0.15	0.22	8.8	10	77.1	0.01	0.01	1.1

Tabelle 8: Zusammenstellung der Hybridplasmide, deren Genprodukte im E. coli Minizellsystem untersucht wurden

Hybridplasmid	Inseriertes Fragment	Vektor	Kodiertes Protein	Kontrolle der Expression
PGM1000	HindIII/XhoI-Fragment von H5	pBR322	gp3	Tc Promoter
PGM1200	HindIII/XhoI-Fragment von HT12/4	pBR322	HTgp3	"
PGM1201	HindIII/XhoI-Fragment von NT1/1	pBR322	NTgp3	"
PGM1208	MstII/NdeI-Fragment von PGM1205	PGM1000	gp3	lac-Promoter
PGM1209	PstI/MstII-Fragment von PGM1206	PGM1200	HTgp3	"
PGM1210	PstI/MstII-Fragment von PGM1207	PGM1201	NTgp3	"

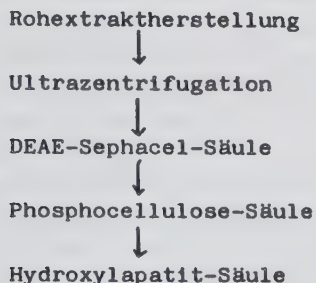
d) Isolierung und Charakterisierung des Proteins gp3

1. Einführung in die Problemstellung

Die Transduktionsexperimente erwiesen sich als exzellentes System, um zu zeigen, daß die eigentliche biologische Funktion des Proteins gp3 in der Erkennung einer Region innerhalb seines eigenen Gens liegt.

Um jedoch das Genprodukt 3 neben seiner biologischen Funktion auch proteinchemisch charakterisieren zu können, war es von Bedeutung, eine Reinigung für dieses Proteins auszuarbeiten. Bei jeder Proteinreinigung ist es von Nutzen, wenn man ein Nachweissystem für die Aktivität des Proteins hat. Die Aktivität des Genprodukts 3 kann man bei den einzelnen Reinigungsschritten durch in vitro-Verpackung von L-DNS nachweisen. Ein in vitro-Verpackungssystem für P22 wurde von Stobel und Schmieger (1979) entwickelt. Das Prinzip der in vitro-DNS-Verpackung beruht auf der Komplementation zweier Zellextrakte, die durch Infektion des Salmonella -Stamms DB5575 mit den entsprechenden Ambermutanten von P22 hergestellt werden. Für den Nachweis der Aktivität des Genprodukts 3 werden 25 μ l eines Zell- bzw. Säulenextrakts, der das Protein gp3 enthält (3^+), zu 25 μ l 3am13am Zellextrakt (3^-) pipettiert. Nach Zugabe von L-DNS werden die dabei gebildeten Phagenpartikel auf dem Salmonella -Stamm His(sie) ausplattiert. Der Bakterienstamm His(sie) ist lysogen für den Phagen P22. Deshalb können nur heteroimmune Phagen mit L-DNS zu einer Lyse der Zelle führen. Die entstandenen Phagenpartikel (pfu/ml) sind ein Maß für die Aktivität des Proteins gp3. Poteete u. Botstein (1979) entwickelten erstmals ein Reinigungsverfahren für die Proteine gp2 und gp3. Sie versuchten, beide Proteine aus einem Salmonella -Stamm zu reinigen, der mit einem Phagen infiziert war, von dem diese Proteine exprimiert wurden.

Die Reinigung der Proteine gp2 und gp3 erfolgte nach folgendem Schema:



Poteete u. Botstein (1979) gelang es jedoch nur, die Aktivität des Proteins gp2 durch in vitro-DNS-Verpackung nachzuweisen. Für den Aktivitätsnachweis verwendeten sie einen 2am13am Zellextrakt (2⁻).

E. Koch aus unserer Arbeitsgruppe gelang es erstmals, die Aktivität des Proteins gp3 durch in vitro-DNS-Verpackung nachzuweisen (Schmieger u. Koch 1987, im Druck). Sie verbesserte die Ausbeute der in vitro-Verpackung und wiederholte die Reinigung der Proteine gp2 und gp3 nach der Vorschrift von Poteete u. Botstein (1979). Bereits nach dem 1. Anreicherungsschritt der Ultrazentrifugation fiel die Aktivität des Proteins gp3 sehr stark ab. Nach der DEAE-Sephacel-Säule waren die Aktivitätswerte noch viel geringer. Sie konnte jedoch trotz der geringen Aktivitätswerte zeigen, daß das Protein gp3 nicht nur als Komplex mit dem Protein gp2, sondern auch in freier Form vorliegen kann. Nach der 2. Säule (Phosphocellulose-Säule) konnte sie allerdings keine Aktivität des Genprodukts 3 mehr nachweisen.

Da eine Reinigung des Proteins gp3 auf Grund der hohen Aktivitätsverluste nicht möglich war, hielt ich es für sinnvoller, mich nicht an der Vorschrift von Poteete et al. (1979) zu orientieren, sondern ein eigenes Reinigungsverfahren mit verbesserten Bedingungen für das Genprodukt 3 zu entwickeln.

2. Zellaufschluß bei Salmonella typhimurium

Bei jeder Proteinreinigung ist es erforderlich, den Bakterienstamm mit dem entsprechenden rekombinanten Plasmid auf möglichst schonende Weise aufzubrechen. Als einfachste und schonendste Methode für den Zellaufschluß bei der Reinigung des Proteins gp3 erwies sich eine Überinfektion des Salmonella-Stamms 4412rec⁻ pGM1208 mit dem Phagen 2aml3am bei einer Zelldichte von OD=0,5 (580nm). Nach einer Inkubation von 20 min. bei 37 °C mit dem Bakteriophagen können die Zellen abzentrifugiert und in Verpackungspuffer aufgenommen werden. Die Salmonellen sind nach dreimaligem Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen in Eiswasser vollständig aufgebrochen. Die Vollständigkeit des Zellaufschlusses kann durch mikroskopische Betrachtung nachgewiesen werden. Für die Überinfektion wurde der Phage 2aml3am gewählt, da durch die Ambermutation im Lysigen 13 eine vorzeitige Lyse der Bakterienkultur verhindert wird. Die Ambermutation im Gen 2 verhindert die Bildung eines funktionsfähigen Genprodukts 2. Dadurch kann das Protein gp3 unabhängig vom Genprodukt 2 isoliert werden. Nach der Herstellung des Rohextrakts wird der Zellextrakt 1:2 bis 1:3 mit Puffer (25 mM Tris-HCl, 3mM Mercaptoethanol) verdünnt und die Membranen, Ribosomen und weiteren Zellfragmente durch Ultrazentrifugation bei 100.000 g abgetrennt.

Die Aktivität des Proteins gp3 wurde bei jedem Reinigungsschritt durch in vitro-DNS-Verpackung getestet. Wenn man die Aktivität des Rohextrakts gleich 100% setzt, so konnte ich nach der Ultrazentrifugation lediglich 2-8% der Ausgangsaktivität nachweisen (Tab.9). Diesen starken Aktivitätsabfall hatte auch E.Koch, als sie die Proteinreinigung nach der Vorschrift von Poteete et al. (1979) durchführte. Um festzustellen, ob der Aktivitätsverlust des Proteins gp3 auf einer Empfindlichkeit des Proteins gegenüber Proteasen beruht, nahm ich den Rohextrakt in Verpackungspuffer mit 0,1 mM PMSF auf und führte die Ultrazentrifugation ebenfalls in Gegenwart von PMSF durch. PMSF ist ein Proteaseinhibitor, der speziell gegen Serinproteasen wirkt (James 1978). Nach dem Ultrazentrifugationsschritt, konnte ich eine Steigerung der gp3-Aktivität um den Faktor 10 bis 20 im Vergleich zur Ausgangsaktivität nachweisen (Tab.9). Da die Zellen bei der

Herstellung des Rohextrakts sehr stark konzentriert werden (1:250), kann die Aktivität des Genprodukts 3 nicht sehr exakt ermittelt werden. Deshalb kann eine Steigerung der gp3-Aktivität des UZ-Überstands um den Faktor 10 bis 20 im Vergleich zur Aktivität des Rohextrakts durchaus vertretbar sein. Auf Grund dieser Resultate war die Zugabe von PMSF bei jedem Reinigungsschritt unbedingt erforderlich. Bei den anderen Aufschlußmethoden, die ich getestet habe, war es notwendig, den Bakterienstamm mit Lysozym/EDTA und wiederholtem Einfrieren und Auftauen in flüssigem Stickstoff vorzubehandeln. Danach konnten die Zellen entweder mit Ultraschall oder mit der Frenchpress bei 12000 psi aufgebrochen werden. Beide Aufschlußmethoden erwiesen sich als nachteilig, da sie trotz der Anwesenheit von PMSF im Puffer mit hohen Aktivitätsverlusten des Genprodukts 3 verbunden waren.

Tabelle 9: Vergleich der gp3-Aktivität des Rohextrakts und des UZ-Überstands in Abhängigkeit von PMSF. 2 bis 3ml eines Rohextrakts von 4412rec⁻pGM1208 wurden 1:3 mit Puffer (25 mM Tris-HCl, 3mM β -Mercaptoethanol) verdünnt und danach 2 h bei 100.000 g zentrifugiert. Bei jeweils 3 Experimenten wurde 0,1 mM PMSF dem Puffer zugesetzt.

Experiment	Rohextrakt Ges.Aktivität (pfu)	UZ-Überstand Ges.Aktivität (pfu)	0,1 mM PMSF im Puffer
1	6×10^5	$1,2 \times 10^4$	-
2	$4,2 \times 10^5$	$2,1 \times 10^4$	-
3	$5,2 \times 10^5$	$4,2 \times 10^6$	-
4	7×10^5	$7,2 \times 10^6$	+
5	$6,5 \times 10^5$	$9,1 \times 10^6$	+
6	5×10^5	1×10^6	+

3. Entfernung der DNS aus dem Zellextrakt

Um eine spezifische Bindung an eine Säule zu erhalten, ist es bei der Reinigung jedes DNS-bindenden Proteins unbedingt erforderlich die DNS aus dem Zellextrakt zu entfernen. Geschieht dies nicht, so erhält man man bei einem DNS-bindenden Protein, wie z.B. dem Protein gp3, je nach verwendeter Säule Aktivitätsverteilungen, die auf eine unspezifische Bindung schließen lassen (Abb.11,12).

Abb.11 zeigt die Aktivitätsverteilung der Proteine gp2 und gp3 nach Auftrennung über eine DEAE-Sephacel-Säule ohne vorherige Abtrennung der DNS. Die graphische Darstellung wurde der Veröffentlichung von Schmieger u. Koch (1987 im Druck) entnommen. Wie aus Abb.11 ersichtlich ist, bindet das Protein gp3 nicht spezifisch an die DEAE-Sephacel-Säule, sondern wird über die gesamte Säule eluiert.

Eine andere Art von Aktivitätsverteilung erhält man, wenn man eine Affinitätschromatographie mit Heparin Sepharose CL 6B ohne Ausfällung der DNS durchführt (Abb.12). In einem Vorversuch wurde 1 ml eines UZ-Überstands des Salmonella -Stamms 4412rec⁻pGM1208 ohne Entfernung der DNS auf eine 1 ml Heparin-Säule aufgetragen, mit 5 ml Säulenpuffer nachgewaschen und dann jeweils 1 ml einer NaCl-Konzentration von 100 bis 700 mM in Schritten von 100 mM aufgegeben. Die Fraktionen, die bei einer Salzkonzentration größer als 400 mM NaCl aufgefangen wurden, wurden dialysiert, da eine hohe Salzkonzentration die in vitro-DNS-Verpackung (Tab.10) stört.

Wie aus Abb.12 ersichtlich ist, findet man 90% der ermittelten gp3-Gesamtaktivität im Durchlauf (Fraktionen 1-7). Bei der Anreicherung von Restriktionsendonukleasen, die ebenfalls an DNS binden, verwendet man im allgemeinen Streptomycinsulfat oder Polyethylenimin für eine Ausfällung der DNS. Dabei erfolgt die Entfernung der DNS im allgemeinen in Gegenwart von 0,2 M NaCl (Atkinson u. Jack 1973, Pirrota u. Bickle 1980, Bickle et al. 1977). Diese Salzkonzentration erwies sich bei der Reinigung von Restriktionsendonukleasen als ausreichend, um die Interaktion zwischen Protein und DNS aufzuheben.

Ich versuchte daher in einem Vorversuch, die DNS aus 1 ml UZ-Überstand des Salmonella -Stamms 4412rec⁻pGM1208 in Gegenwart von 0,2 M NaCl mit Streptomycinsulfat und

Polyethylenimin zu entfernen. Die genaue Versuchsdurchführung ist in Material und Methoden beschrieben. Nach Zentrifugation bei 10.000 rpm für 10 min. zur Abtrennung der ausgefällten DNS stellte ich fest, daß der DNS-freie Überstand nur 1,5% bzw. 4% der eingesetzten Aktivität an gp3 enthielt (Tab.11).

Da dieses Resultat für mich unerwartet war, untersuchte ich, inwieweit die Entfernung der DNS von der Salzkonzentration und dem Reagenz abhängig ist.

Die Experimente wurden jeweils mit 1 ml eines UZ-Extrakts von 4412rec_pGM1208 durchgeführt, wobei die Ausgangsaktivität des Proteins gp3 gleich 100% gesetzt wurde. Die durch Streptomycinsulfat bzw. Polyethylenimin in Gegenwart der jeweiligen Salzkonzentration (0,2-0,8 M NaCl) ausgefällte DNS wurde abzentrifugiert und die im Überstand verbliebene gp3-Aktivität getestet (Tab.11). Bei einer Salzkonzentration von 0,6 M bzw. 0,8 M mußte der Überstand dialysiert werden, da die in vitro-DNS-Verpackung durch hohe Salzkonzentrationen gestört wird (Tab.10).

Tabelle 10: Die Aktivität des Proteins gp3 in Abhängigkeit von der Salzkonzentration. Jeweils 25 μ l eines UZ-Überstands, der eingefroren war, wurde mit verschiedenen Salzkonzentrationen versetzt und anschließend die gp3-Aktivität durch in vitro-Verpackung getestet.

NaCl Konzentration (M)	gp3-Aktivität (pfu/ml)
0	$2,7 \times 10^6$
0,2	$2,1 \times 10^6$
0,4	3×10^6
0,6	$4,2 \times 10^4$
0,8	1×10^4

Tabelle 11: Die Aktivität des Proteins gp3 im DNS-freien Überstand in Abhängigkeit von dem Reagenz und der Salzkonzentration.

	Streptomycinsulfat (Endkonz. 2 %)	Polyethylenimin (Endkonz. 2 %)
0,2 M NaCl	4 %	1,5 %
0,4 M NaCl	15 %	3,7 %
0,6 M NaCl	64 %	43,0 %
0,8 M NaCl	65 %	45,0 %

Aus Tabelle 11 ist ersichtlich, daß Streptomycinsulfat in einer Endkonzentration von 2% offensichtlich geeigneter ist für eine Entfernung der DNS als Polyethylenimin. Im Gegensatz zur Reinigung von Restriktionsendonukleasen ist für das Genprodukt 3 eine wesentlich höhere Salzkonzentration (0,6 M NaCl) notwendig, um die Interaktion dieses Proteins mit der DNS aufzuheben.

Abb.13 zeigt die Aktivitätsverteilung des Proteins gp3, wenn die Affinitätschromatographie mit Heparin nach Entfernung der DNS aus dem UZ-Überstand durchgeführt wurde. Der Vorversuch wurde mit 1 ml eines UZ-Extrakts des Stamms 4412rec⁻pGM1208 durchgeführt. Nach Entfernung der DNS mit Streptomycinsulfat in Gegenwart von 0,6 M NaCl wurde der Extrakt auf eine 1 ml Heparin-Säule aufgetragen, mit 5 ml Puffer nachgewaschen und anschließend jeweils 1 ml einer Salzkonzentration von 0,1 bis 1 M NaCl in Schritten von 100 mM NaCl aufgegeben.

Im Vergleich zu Abb.12 erkennt man nun deutlich, daß das Protein gp3 spezifisch an die Heparin-Säule gebunden wurde. Das Protein wurde bei 0,4 bzw. 0,7 M NaCl eluiert. Die Aktivität im Durchlauf war vernachlässigbar gering (1,4% der ermittelten Gesamtaktivität). Dieser Vorversuch zeigte, daß Heparin Sepharose CL 6B eine geeignete Säule für die Reinigung des Proteins gp3 ist. Ich wählte diese Säule als 1. Chromatographieschritt im Hauptversuch.

Abb.11: Anionenaustauschchromatographie mit DEAE-Sephacel. Die Aktivitätsverteilungen der Proteine gp3 (○—○) und gp2 (●—●) sind eingezeichnet. Die graphische Darstellung wurde der Publikation von Schmieger u. Koch (1987, im Druck entnommen).

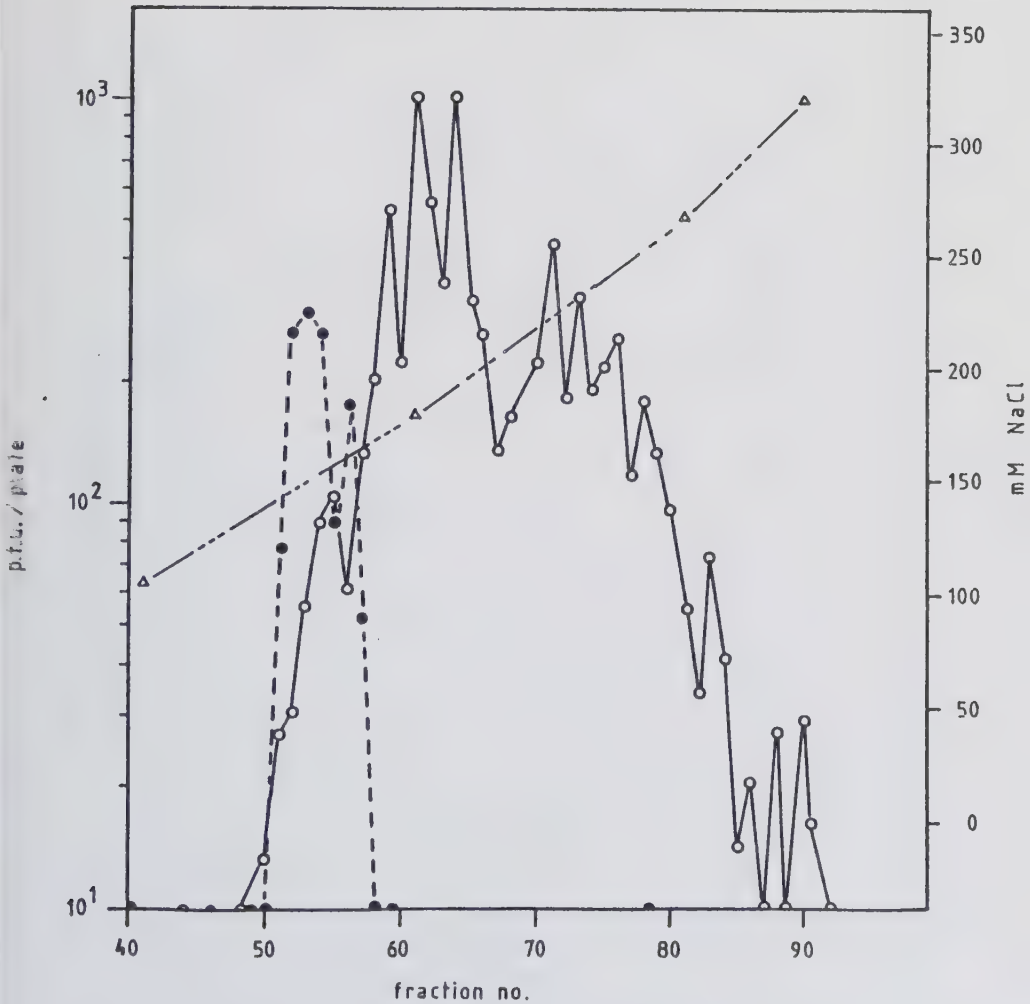


Abb.12: Affinitätschromatographie mit Heparin Sepharose CL 6B
ohne Entfernung der DNS

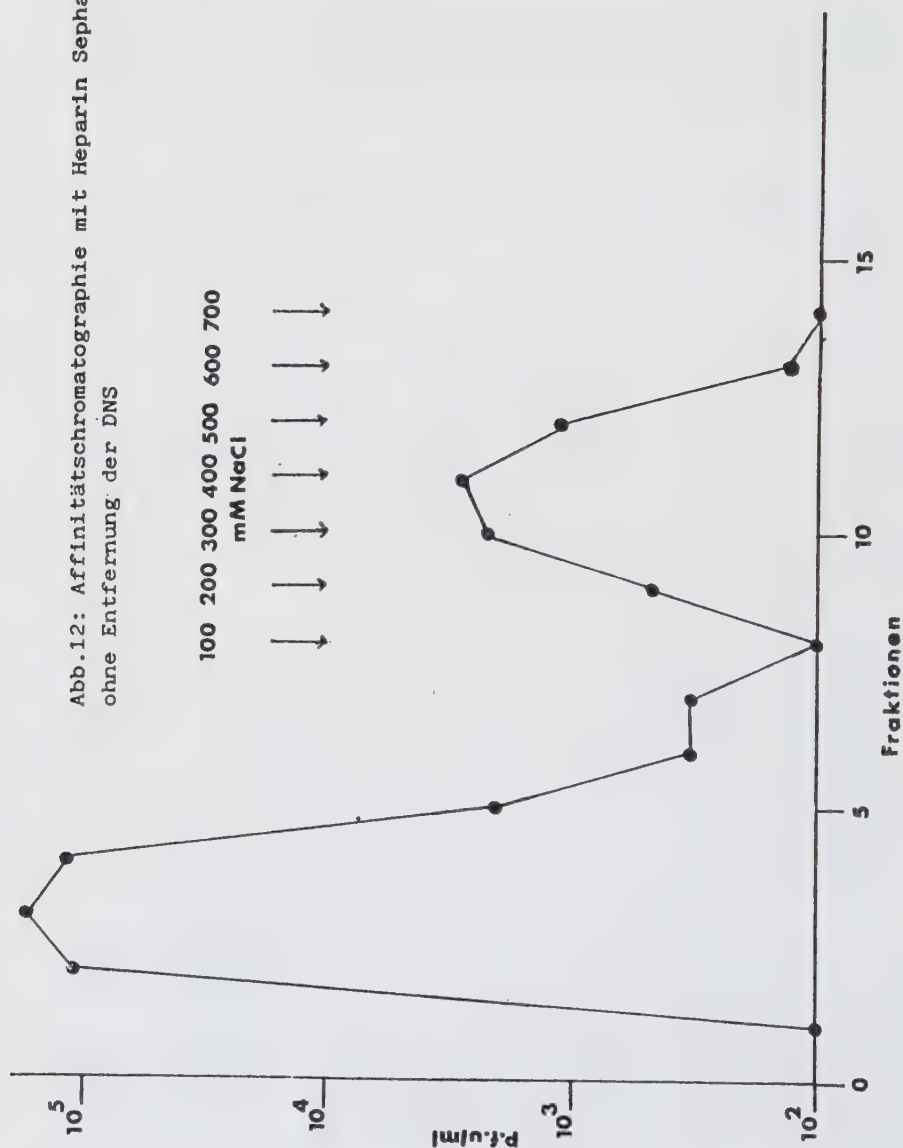
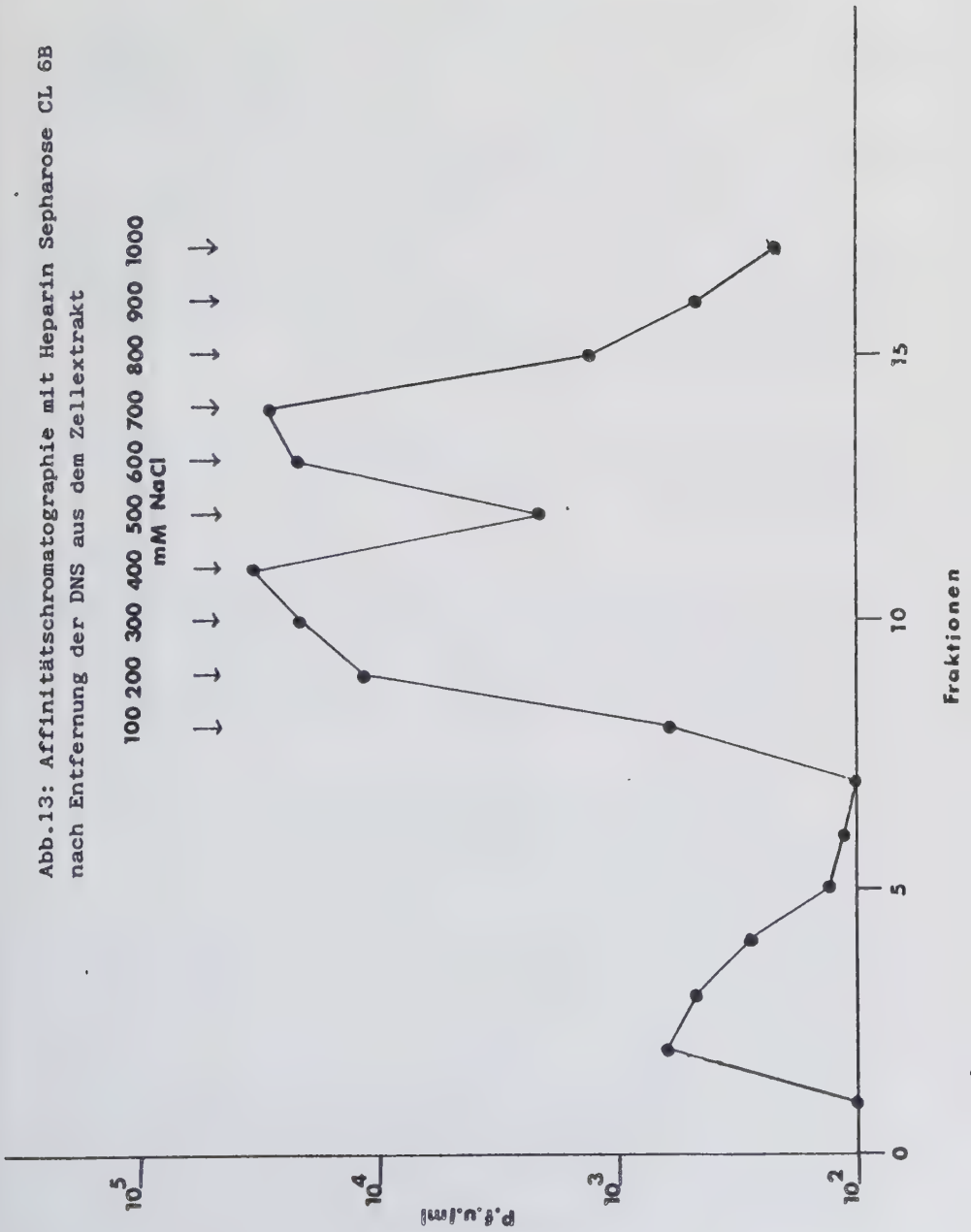


Abb.13: Affinitätschromatographie mit Heparin Sepharose CL 6B
nach Entfernung der DNS aus dem Zellextrakt



4. Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung

Nach der Ausfällung der DNS aus dem Zellextrakt wurde das Protein gp3 durch eine fraktionierte Ammoniumsulfatfällung weiter angereichert. Um die optimale Konzentration zu ermitteln wurde mit 20 ml DNS-freiem UZ-Überstand, der eine gp3-Gesamtaktivität von $8,2 \times 10^6$ pfu hatte, eine Ammoniumsulfatfraktionierung durchgeführt (s. Material u. Methoden). Ich ermittelte die gp3-Aktivität in den Bereichen von 0-30%, 30-60% und 60-90% Sättigung mit Ammoniumsulfat. Da die in vitro-Verpackung durch hohe Salzkonzentrationen gestört wird (Tab.10), wurde die gp3-Aktivität jeweils nach Dialyse der Ammoniumsulfatfraktion ermittelt (Tab.12).

Tabelle 12: gp3-Aktivität in Abhängigkeit von der Sättigung mit Ammoniumsulfat und prozentualer Anteil an der Ausgangsaktivität.

Bereich der Sättigung mit Ammoniumsulfat	gp3-Ges.Aktivität (pfu)	Prozentualer Anteil an der Ausgangsaktivität
0-30 %	$2,8 \times 10^4$	0,3 %
30-60 %	$4,5 \times 10^6$	54,0 %
60-90 %	$1,0 \times 10^5$	1,2 %

5. Gelfiltration mit Sephadex G50 und G75

Die Ausschlußgrenze von Sephadex G50 liegt bei 30.000 D. 5 ml einer Ammoniumsulfatfraktion (30-60%) von 4412rec⁻ pGM1208 wurden auf eine 89 cm lange Sephadex G50 Säule aufgetragen. Die Proteinfraktion hatte eine gp3-Gesamtaktivität von 3×10^6 pfu und enthielt 12 mg Protein. Die Auftrennung der Proteine erfolgte Über Nacht bei einer Geschwindigkeit von 7,5 ml/h.

Wie aus Abbildung 14 ersichtlich ist, konnte die Aktivität des Proteins gp3 hauptsächlich im Ausschlußbereich der Säule nachgewiesen werden (Fraktion 58-70). Der Ausschluß der Säule wurde durch Auftragen von Dextranblau (MG:2.000.000 D) ermittelt (s. Material u. Methoden).

Die Fraktionen 77-90 können auf Grund der Eichung der Säule mit

Myoglobin (MG:17.800 D) als der Bereich angesehen werden, in dem die monomere Form von gp3 (MG:17.800 D) vorliegt. Dieser Trennbereich enthielt jedoch nur etwa 3,7% der wiedergewonnenen Gesamtaktivität.

Die Aktivitätsverteilung des Genprodukts 3 zeigt, daß das Protein bevorzugt in einer Aggregatform vorliegt, die entweder auf einer Aggregation des Proteins mit sich selbst (Homo-oligomer) oder mit anderen Zellkomponenten (Heterooligomer) beruhen kann.

Um genauere Aussagen über den oligomeren Zustand des Proteins gp3 machen zu können, wurde eine Gelfiltration mit Sephadex G75 durchgeführt. Sephadex G75 Fine eignet sich für eine Trennung von Proteinen zwischen 3000 - 80.000 D.

3 ml einer Ammoniumsulfatfraktion (30-60%) von 4412rec⁻ pGM1208 wurden auf eine 60,5 cm lange Sephadex G75 Fine Säule aufgetragen.

Die Proteinfraktion hatte eine gp3-Gesamtaktivität von 2×10^6 pfu und enthielt 5,7 mg Protein.

Abb. 15 zeigt, daß etwa 86% der gp3-Aktivität im Ausschlußbereich der Säule sind (Fraktion 44-57). Im Trennbereich der Säule findet man neben der monomeren Form (Fraktion 66-81) noch oligomere Formen. Sollte es sich dabei um Homooligomere handeln, so könnten sie auf Grund des Trennbereichs der Säule aus 2 bis 4 Molekülen des Proteins gp3 bestehen.

Beide Gelfiltrationen (Abb.14,15) zeigen deutlich, daß das Protein gp3 eine Vorliebe zur Aggregation besitzt.

Abb.14: Gelfiltration mit Sephadex G50

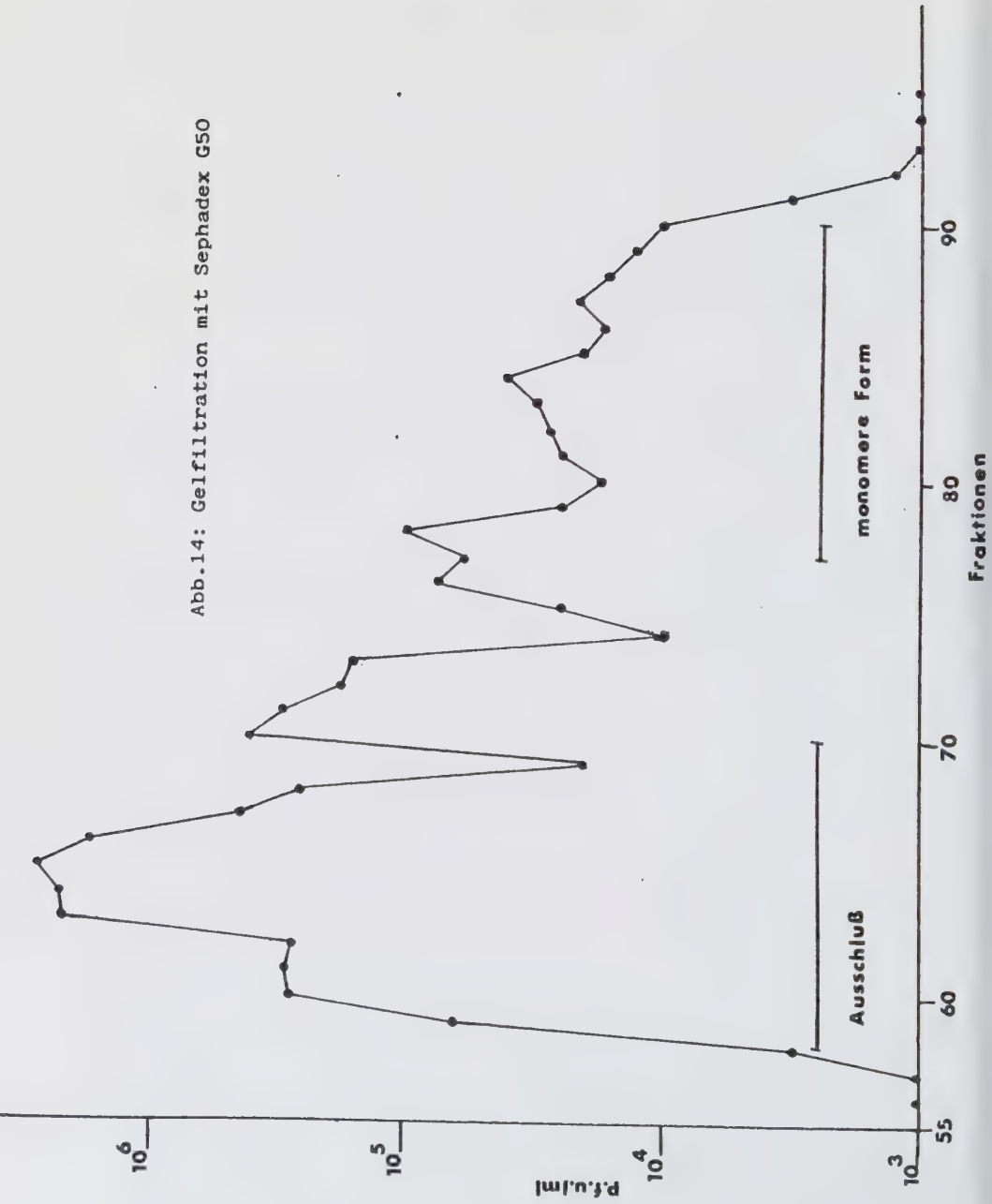
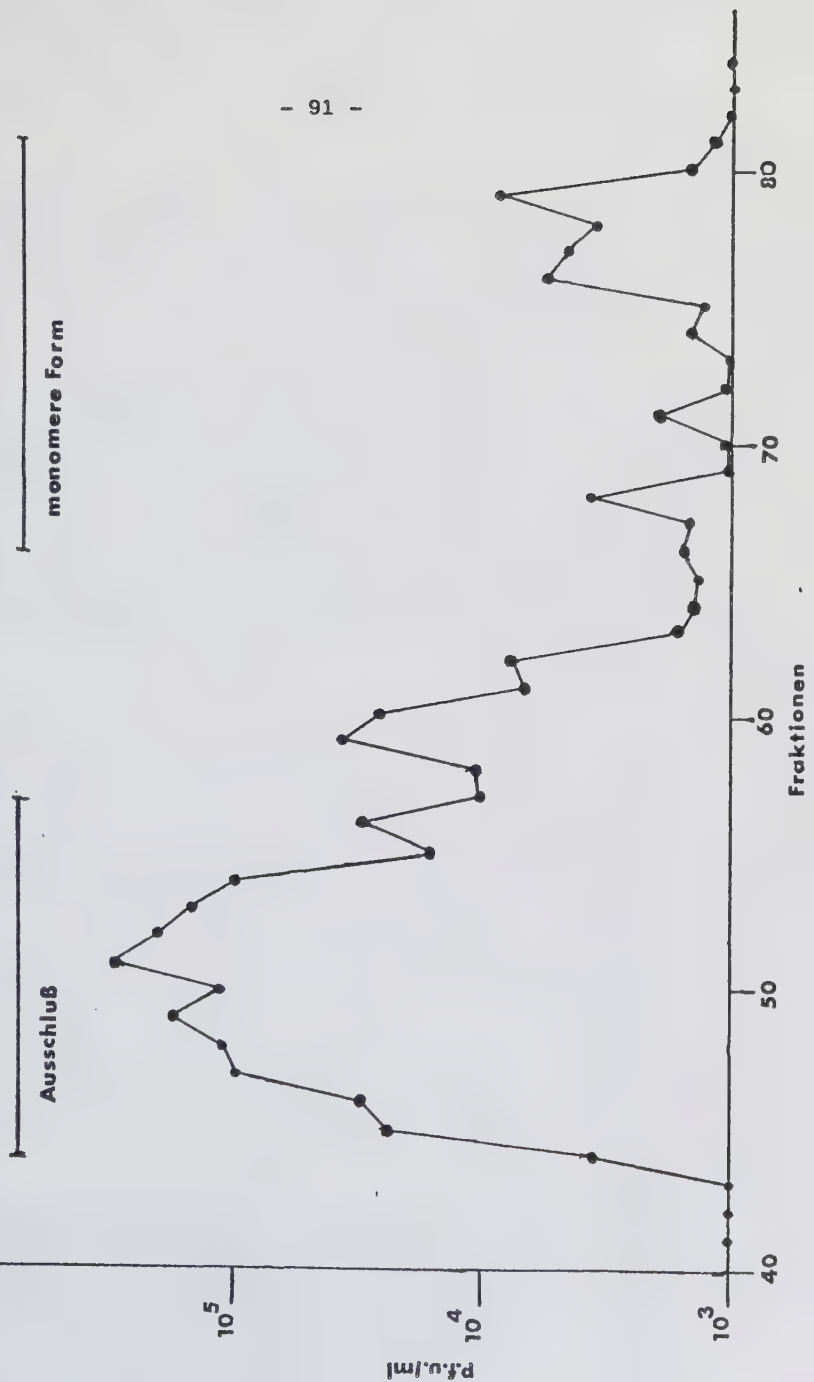


Abb.15: Gelfiltration mit Sephadex G75 Fine



6. Affinitätschromatographie mit Heparin Sepharose CL 6B

Heparin Sepharose CL 6B wird für die Reinigung von Restriktionsendonukleasen, Plasmaproteinen, Lipasen, Steroidrezeptoren usw. verwendet (Bickle et al. 1977, Farooqui 1980, Bajaj et al. 1981).

Aus einem Vorversuch mit einer 1 ml Heparin-Säule wußte ich, daß das Protein gp3 eine Affinität zu Heparin besitzt (Abb.13). Meine ersten Hauptversuche mit Heparin führte ich, wie in Material und Methoden beschrieben, durch. Im Gegensatz zu dem dort beschriebenen Säulenpuffer verwendete ich anfangs Puffer ohne Zusatz von Tween 80 und $MgCl_2$.

10 ml einer Ammoniumsulfatfraktion (30-60%) von 4412rec⁻ pGM1208 wurden auf eine 5,5 ml Heparin Sepharose CL 6B Säule gepumpt. Die Ammoniumsulfatfraktion besaß eine gp3-Gesamtaktivität von $1,5 \times 10^6$ pfu und enthielt 12 mg Protein.

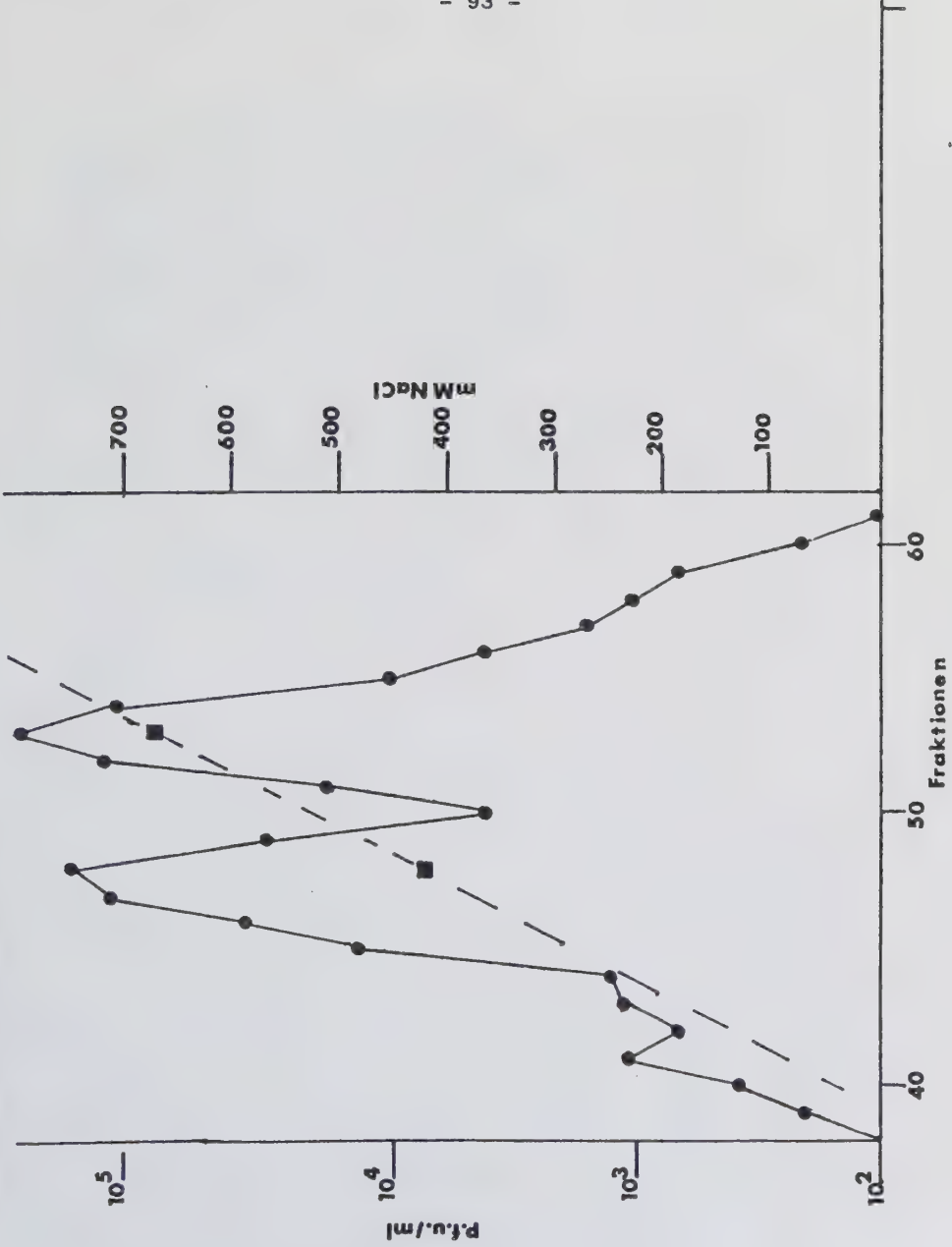
Die an Heparin gebundenen Proteine werden mit einem Salzgradienten von 0-1 M NaCl eluiert. Aus einem Vorversuch (Abb.13) wußte ich, daß das Protein gp3 bei einer Salzkonzentration ab 0,4 M NaCl eluiert wird. Durch Leitfähigkeitsmessungen und an Hand einer Eichkurve konnten die Fraktionen in diesem Bereich ermittelt werden. Da NaCl in einer Konzentration größer als 0,4 M die in vitro -Verpackung stört (Tab.10), wurden die Fraktionen zwischen 0,4-1 M NaCl dialysiert und danach durch in vitro-Verpackung auf ihre gp3-Aktivität getestet.

Wie aus der Aktivitätsverteilung in Abb.16 ersichtlich ist, kann man zwei voneinander getrennte Aktivitätspeaks des Proteins gp3 erkennen. Diese Aktivitätspeaks waren bereits in Abb.13 zu erkennen. Die Elution des Proteins gp3 erfolgt bei 0,42 M und 0,67 M NaCl.

Auf Grund der Resultate der Gelfiltration mit Sephadex G50 und G75 lag es nahe, das Auftreten von zwei Aktivitätspeaks mit der Tendenz des Proteins zur Aggregation in Verbindung zu bringen. Eine Interpretationsmöglichkeit wäre, daß die Aggregatform eine andere Bindungsfähigkeit an Heparin besitzt als die monomere Form.

Diese Vermutung konnte ich bestätigen, indem ich die Affinitätschromatographie in Gegenwart von Tween 80 durchführte.

Abb.16: Affinitätschromatographie mit Heparin Sepharöse CL 6B
ohne Zusatz von Tween



7. Einfluß von Tween 80 auf die Aggregate des Proteins gp3

Um festzustellen, ob Tween 80 in der Lage ist, die oligomere Form des Proteins gp3 aufzulösen, wurde nun jeder Reinigungsschritt, auch die Affinitätschromatographie mit Heparin Sepharose CL 6B, in Gegenwart von 0,01% Tween 80 durchgeführt. 10 ml einer Ammoniumsulfatfraktion von 4412rec₇ pGM12008 wurden dazu auf die Heparin-Säule gepumpt. Die Proteinfraction hatte eine gp3-Gesamtaktivität von 3×10^6 pfu und enthielt 38 mg Protein.

Vergleicht man die gp3-Aktivitätsverteilung dieser Chromatographie (Abb.17) mit der Affinitätschromatographie, die ohne Tween 80 durchgeführt wurde (Abb.16), so erkennt man nur einen Aktivitätspeak.

Die Elution des Proteins erfolgte bei 0,67 M NaCl. Diese Chromatographie zeigt, daß Tween 80 in einer Konzentration von 0,01% ein geeignetes Reagenz ist, um die Aggregation des Proteins gp3 aufzuheben. Außerdem kann man daraus ersehen, daß die Aggregatform schwächer an Heparin bindet als die monomere Form des Proteins gp3.

Der einzige Nachteil der Chromatographie mit Heparin Sepharose CL 6B in Gegenwart von Detergens ist, daß die Kapazität von Heparin nach mehreren Proteinauftrennungen sehr schnell nachläßt. Dies ist vermutlich auf die Empfindlichkeit des Säulenmaterials gegenüber Tween 80 zurückzuführen.

Um das Protein gp3 weiter anzureichern, war es notwendig, eine geeignete Säule für den 2. Chromatographieschritt zu finden. Ich versuchte, sowohl eine Gelfiltration mit Sephadex G75 Superfine als auch eine Affinitätschromatographie mit DNS-Cellulose anzuschließen. Beide Reinigungsschritte wurden in Gegenwart von Tween 80 durchgeführt. Sephadex G75 Superfine trennt Proteine zwischen 3000 und 70.000 D. Es wurde bewußt dieser Trennbereich gewählt, da Detergenzien die Konformation und das Laufverhalten eines Proteins stark beeinflussen können (pers. Mitteilung von Dr.Schach, Pharmacia Freiburg).

5 ml einer gp3-Peakfraktion der Heparin-Säule wurden auf eine 89 cm lange Sephadex G75 Säule aufgegeben. Die Proteinfraction enthielt 230 µg Protein und hatte eine Gesamtaktivität von 4×10^6 pfu. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in Gegenwart von 0,02% Tween 80.

Die Anhebung der Detergenskonzentration von 0,01% auf 0,02% Tween 80 erfolgte auf Anregung von Dr.Schach (Pharmacia Freiburg). Dadurch sollte eine möglichst quantitative Auflösung des oligomeren Zustands des Proteins gp3 erzielt werden. Wesentliche Voraussetzung dafür war, daß Sephadex G75 unempfindlich gegenüber Detergens ist und daß Tween 80 in einer Konzentration von 0,02% keinen negativen Einfluß auf die Aktivität des Proteins gp3 bei der DNS-Verpackung hat. Betrachtet man die Aktivitätsverteilung des Proteins gp3 (Abb.18), so findet man im Ausschluß der Säule (Fraktion 63-73) vernachlässigbar geringe Aktivitätswerte. Die Hauptaktivität, die jedoch nur 2% der aufgetragenen gp3-Aktivität darstellt, kann in den Fraktionen 160-168 nachgewiesen werden. Auf Grund der Eichung der Säule mit Myoglobin sind die Fraktionen 153-169 der Trennbereich, in dem das Protein gp3 in monomerer Form vorliegt.

Abb.17: Affinitätschromatographie mit Heparin Sepharose CL 6B
in Gegenwart von 0,01% Tween 80

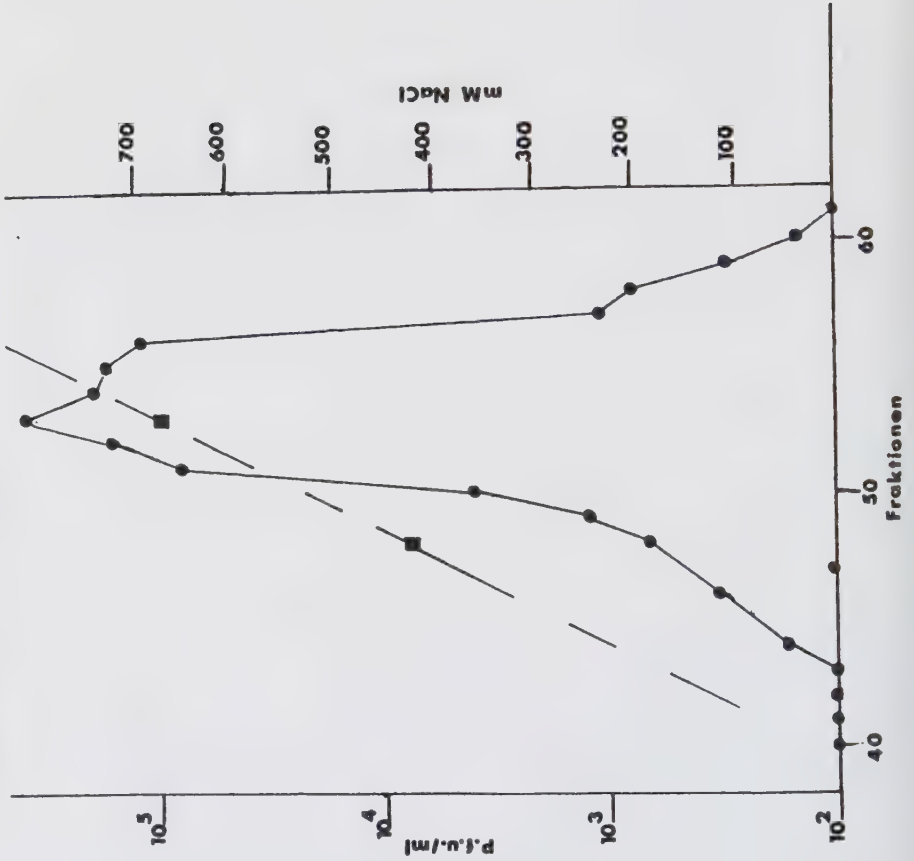


Abb.18: Gelfiltration mit Sephadex G75 Superfine in Gegenwart von 0,02% Tween 80



8. Untersuchung der Stabilität des Proteins gp3 bei den einzelnen Reinigungsstufen

Nach jedem Reinigungsschritt wurden die Proteinfractionen bei -20°C eingefroren. Nachdem die gp3-Aktivität durch in vitro-Verpackung ermittelt war, wurde die Reinigung fortgesetzt.

Der Rohextrakt, die UZ- und die Ammoniumsulfatfraktion konnten beliebig oft eingefroren werden und zeigten auch nach mehreren Monaten keinen Abfall in der Aktivität des Proteins gp3. Bei der Heparinpeakfraktion hingegen fiel die gp3-Aktivität schon nach einem Tag auf etwa 5% der Ausgangsaktivität ab (Tab.14).

Um das Protein gp3 zu stabilisieren, pipettierte ich BSA bzw. Gelatine (100 $\mu\text{g/ml}$) in die Säulenfraktionen vor. Beide Reagenzien zeigten jedoch keine stabilisierende Wirkung. Da mehrere Proteine Ionen als Kofaktor für den Erhalt ihrer Aktivität benötigen, testete ich zunächst den Einfluß verschiedener Ionen auf die gp3-Aktivität (Tab.13).

Zu jeweils 25 μl einer Ammoniumsulfatfraktion von 4412rec₋pGM1208, die bei -20°C eingefroren war, wurden die in Tab.13 aufgeführten Ionenkonzentrationen pipettiert und sofort die gp3-Aktivität durch in vitro-Verpackung ermittelt. Wie aus Tabelle 13 ersichtlich ist, steigerte Magnesium (20 mM), im Vergleich zur Kontrolle (Ammoniumsulfatfraktion ohne Zusatz von Ionen), die gp3-Aktivität um den Faktor 2,8, während Kalium (20 mM) nur eine Steigerung um den Faktor 1,6 bewirkte. Die Zugabe von ZnCl_2 und CuCl_2 beeinträchtigte offenbar die in vitro-Verpackung. MnCl_2 und CoCl_2 zeigten keinen aktivitätsfördernden Effekt.

Tabelle 13: Einfluß verschiedener Ionen auf die gp3-Aktivität der Ammoniumsulfatfraktion von 4412rec⁻ pGM1208

getestete Ionenkonzentration	gp3-Aktivität (pfu x 10 ⁶ /ml)	Steigerung- faktor der gp3-Aktivität
10 mM MgCl ₂	4	2,4
20 mM MgCl ₂	4,7	2,8
10 mM KCl	2,3	1,4
20 mM KCl	2,8	1,6
10 mM ZnCl ₂	< 2,8x10 ²	
10 mM CuCl ₂	< 2,8x10 ²	
10 mM MnCl ₂	1,6	0
10 mM CoCl ₂	1,1	0
Ammoniumsulfatfraktion ohne Zusätze	1,7	

Da Magnesium eine leicht aktivierende Wirkung auf das Genprodukt 3 hat, führte ich jeden Reinigungsschritt, auch die Affinitätschromatographie mit Heparin, in Gegenwart von 20 mM MgCl₂ durch. Um festzustellen, ob Magnesium die gp3-Aktivität der Heparinpeakfraktion auch stabilisieren kann, testete ich die gp3-Aktivität einer Fraktion des Heparinaktivitätspeaks sofort nach der Affinitätschromatographie und an 2 darauffolgenden Tagen (Tab.14). Die Fraktion wurde nach der Entnahme von 25 µl für die in vitro-Verpackung immer bei -20°C eingefroren.

Tabelle 14 : gp3-Aktivitäten einer Heparinpeakfraktion an drei aufeinanderfolgenden Tagen in Abhängigkeit von 20 mM MgCl₂ im Säulenpuffer.

	1.Tag	2.Tag	3.Tag	20mM MgCl ₂
gp3-Aktivität (pfu x 10 ⁵ /ml)	5,5	5,9	5,3	+
gp3-Aktivität (pfu x 10 ⁵ /ml)	4	0,2	0,09	-

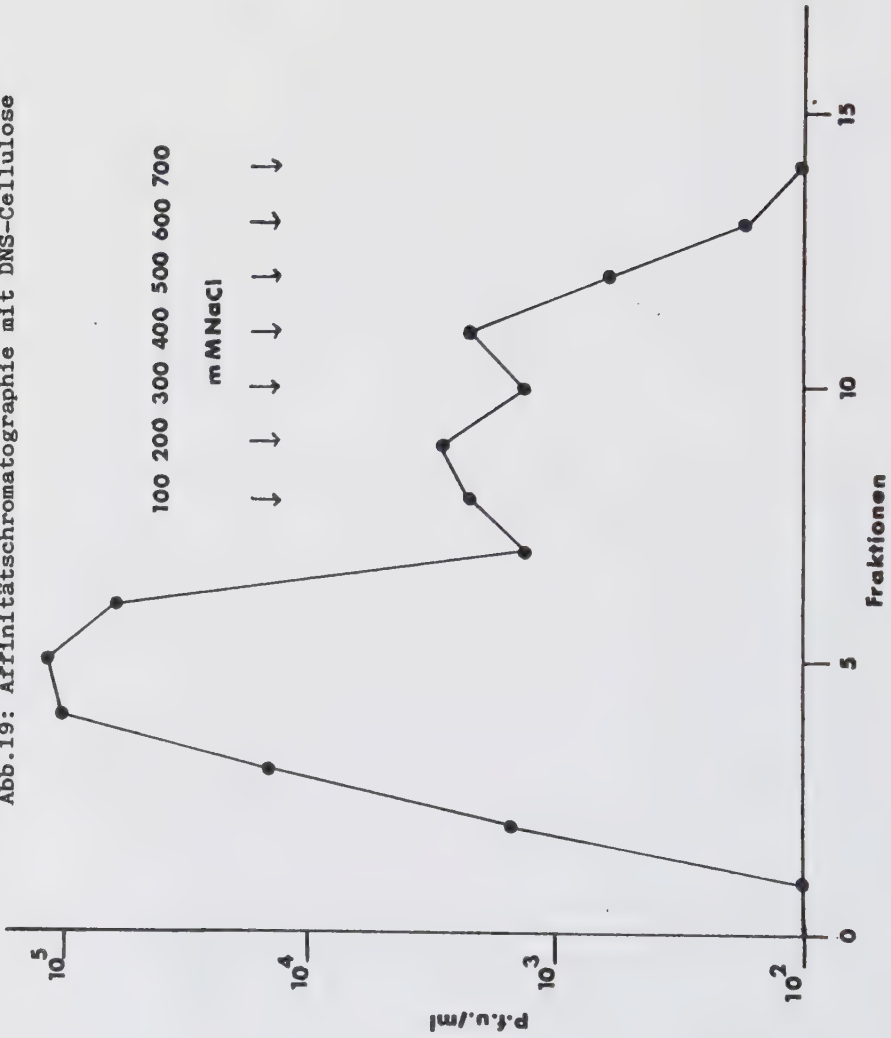
Wie aus Tab.14 ersichtlich ist, kann Magnesium in einer Konzentration von 20 mM die gp3-Aktivität der Heparinpeakfraktion zumindest zwei Tage lang stabilisieren.

Da sich Magnesium als geeignet erwies, um den Aktivitätsabfall des Proteins gp3 der Heparinpeakfraktion zu verhindern, führte ich auch den 2. Chromatographieschritt, die Gelfiltration mit Sephadex G75 Superfine, in Gegenwart von 20 mM $MgCl_2$ durch (Abb.18). Der starke Aktivitätsabfall des Proteins gp3 auf 2% der Ausgangsaktivität ließ sich jedoch auch durch Magnesium nicht vermeiden. Auch eine Zugabe von 20 mM KCl in den Säulenpuffer bzw. das Vorpipettieren von BSA oder Gelatine (100 $\mu g/ml$) zu den Säulenfraktionen konnte den starken Aktivitätsabfall des Genprodukts 3 nicht verhindern. Aus diesen Resultaten kann man schließen, daß das Protein gp3 vermutlich neben Magnesium noch ein Protein bzw. eine Zellkomponente als Kofaktor benötigt.

Da bei der Reinigung vieler DNS-bindender Proteine eine Affinitätschromatographie mit DNS-Cellulose durchgeführt wird, hielt ich es für sinnvoll diese Chromatographie als 2. Chromatographieschritt alternativ zur Gelfiltration anzuschließen. Auf Grund der vorliegenden Daten wurde sie ebenfalls mit 0,01% Tween 80 und 20 mM $MgCl_2$ durchgeführt. Die Säule enthielt 0,25-1,5 mg native Kalbsthymus-DNS pro ml Gel. In einem Vorversuch wurde 1 ml eines DNS-freien UZ-Überstands auf eine 1 ml Kalbsthymus-Säule aufgetragen, mit 5ml Säulenpuffer nachgewaschen und jeweils 1 ml einer NaCl-Konzentration von 100 mM bis 700 mM in Schritten von 100 mM NaCl aufgegeben (Abb.19). Wie daraus ersichtlich ist, bindet das Protein gp3 nicht spezifisch an die Säule. 60% der Ausgangsaktivität (90% der wiedergewonnenen Aktivität) sind im Durchlauf (Fraktionen 1-7). Da das Genprodukt 3 keine Spezifität für Kalbsthymus hat, wurde beim Hauptversuch die Heparinpeakfraktion aufgetragen, der Durchlauf sofort getestet und die aktivsten Fraktionen vereinigt. Auch nach mehrmaligem Einfrieren bei $-20^{\circ}C$ blieb die gp3-Aktivität der Peakfraktion konstant. Die Affinitätschromatographie mit DNS-Cellulose erwies sich in Gegenwart von $MgCl_2$ als sinnvoller 2. Chromatographieschritt für eine weitere Anreicherung des Proteins gp3. Der Vorteil dieser Anreicherung

ist, im Vergleich zur Gelfiltration mit Sephadex G75, der Erhalt der Aktivität des Genprodukts 3.

Abb.19: Affinitätschromatographie mit DNS-Cellulose



9. Erzielte Anreicherung

Tabelle 15 und Tabelle 16 zeigen eine Zusammenstellung der Anreicherung des Genprodukts 3 bei den einzelnen Reinigungsschritten.

Nach der Affinitätschromatographie mit Heparin Sepharose CL 6B wurde entweder eine Gelfiltration mit Sephadex G75 (Tab.15) oder eine Affinitätschromatographie mit DNS-Cellulose (Tab.16) angeschlossen.

Bis einschließlich der Affinitätschromatographie mit Heparin Sepharose CL 6B konnte eine Anreicherung um den Faktor 1416 erzielt werden (Tab.15). Die Abreicherung auf 565 nach der Gelfiltration mit Sephadex G75 ist auf den starken Aktivitätsabfall des Proteins gp3 zurückzuführen. Ursache für den Aktivitätsabfall ist vermutlich das Entfernen eines Kofaktors, der ein Protein oder eine zelluläre Komponente sein kann.

Bei dem zweiten Reinigungsverlauf (Tab.16) wurde bei der Affinitätschromatographie mit Heparin Sepharose CL 6B eine Anreicherung um den Faktor 933 erzielt. Nach der angeschlossenen Affinitätschromatographie mit DNS-Cellulose wurde die Anreicherung des Proteins gp3 auf das 1246 fache des Ausgangswertes gesteigert.

Abb. 20 zeigt eine Auftrennung der Proteine der Heparinpeakfraktion auf einem 17,5 % PAA Gel, das einer Silberfärbung unterzogen wurde.

Beim Vergleich der Proteinmuster von 4412rec⁻ ohne Plasmid (Abb.20a) mit dem von 4412rec⁻pGM1208 (Abb.20b) erkennt man bei Abb.20b zwei Proteine mit einem MG von 20 KD und 17,8 KD. Die Position der Proteine ist durch Pfeile gekennzeichnet. Das Protein mit dem MG von 17,8 KD könnte, auch auf Grund der Resultate mit den Minizellen, dem Genprodukt 3 entsprechen. Abb.21 zeigt eine Proteinauftrennung der Ausschlußfraktion der DNS-Cellulose-Säule (Abb.21a) und im Vergleich dazu eine Auftrennung der Peakfraktion der Sephadex G75 Säule (Abb.21b). Die Proteine wurden auf einem 20% PAA Gel aufgetrennt, das ebenfalls einer Silberfärbung unterzogen wurde.

Beim Vergleich der beiden Proteinauftrennungen (Abb.21a,b) erkennt man ein Protein von 17,8 KD, das auf Grund seines Molekulargewichts dem Protein gp3 entsprechen könnte. Bei Abb.21b ist es auf Grund der höheren Reinheit besser zu

identifizieren.

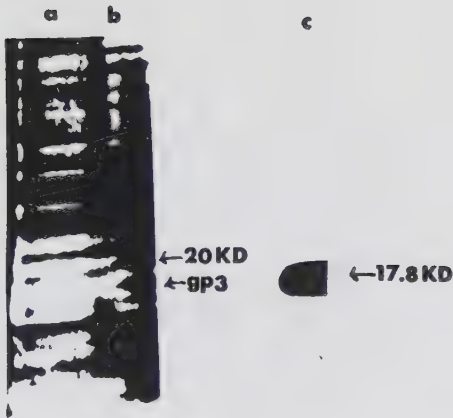


Abb.20: Auftrennung von Proteinen der Heparinpeakfraktion auf einem 17,5% PAA-Gel. Das Gel wurde einer Silberfärbung unterzogen.

- a: Heparinpeakfraktion von 4412rec₋ ohne Plasmid
- b: Heparinpeakfraktion von 4412rec₋ pGM1208
- c: Myoglobin (17,8 KD) als Molekulargewichtsmarker

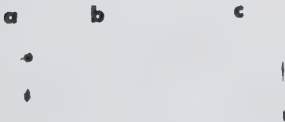


Abb.21: Proteinauftrennung auf einem 20% PAA-Gel. Das Gel wurde einer Silberfärbung unterzogen.

- a: Kalbsthymuspeakfraktion von 4412rec₋ pGM1208
- b: Sephadex G75 Peakfraktion
- c: Myoglobin (17,8 KD) als Molekulargewichtsmarker

gp3→

Tabelle 15: Reinigung des Proteins gp3 aus 4412rec⁻ pgM1208

	Vol. (ml)	Ges. Verp. Akt. (pfu/Ges. Vol.)	Ges. Protein (mg)	Spez. Akt. (pfu/mg)	Anreicherung
Rohextrakt	10,5	$1,9 \times 10^6$	157,5	$1,2 \times 10^4$	
UZ-Extrakt	25	$1,4 \times 10^7$	35	$4,0 \times 10^5$	33
Ammoniumsulfat- fraktion	10	$1,2 \times 10^7$	12,3	$8,4 \times 10^5$	97
Heparinpeak- fraktion	9	$4,0 \times 10^6$	0,23	$2,1 \times 10^7$	1416
Sephadex G75	8	$8,1 \times 10^4$	0,012	$6,8 \times 10^6$	565

Tabelle 16: Reinigung des Proteins gp3 aus 4412rec pGM1208

	Vol. (ml)	Ges. Verp. Akt. (pfu/ml)	Ges. Protein (mg)	Spez. Akt. (pfu/mg)	Anreicherung
Rohextrakt	9	$1,7 \times 10^6$	115	$1,5 \times 10^4$	
UZ-Extrakt	25	$4,2 \times 10^7$	40	$1,0 \times 10^6$	66
Ammoniumsulfat- fraktion	9,5	$1,9 \times 10^7$	13,3	$1,45 \times 10^6$	96
Heparinpeak- fraktion	9,5	$3,0 \times 10^6$	0,21	$1,4 \times 10^7$	933
DNS-Cellulose- peakfraktion	10	$1,2 \times 10^6$	0,064	$1,87 \times 10^7$	1246

D. Diskussion

Der Bakteriophage P22 ist ein temperenter Phage, dessen Wirtsspektrum, soweit es bekannt ist, ausschließlich auf Salmonella -Arten beschränkt ist.

Die Verpackung der DNS ist einer der Aspekte, die bei P22 schon von mehreren Arbeitsgruppen untersucht wurde und bisher immer noch nicht vollständig geklärt werden konnte.

An der Verpackung sind zwei späte Genprodukte gp2 und gp3 beteiligt. Beide sind nicht Bestandteil des Proheads (Susskind u. Botstein 1978).

Es war Ziel dieser Arbeit, das Genprodukt 3 näher zu untersuchen.

Eine Reinigung und biochemische Charakterisierung dieses Proteins war bisher nicht möglich gewesen. Aus den Resultaten unserer und anderer Arbeitsgruppen wußte ich, daß die Hauptprobleme bei der Anreicherung des Proteins gp3 in seiner geringen Expression und seiner hohen Instabilität lagen (Casjens u. King 1974, Schmieger u. Koch 1987, im Druck). Im Vergleich zum gut exprimierten Hauptkopffprotein gp5 findet man ein Expressionsverhältnis von 1:400. Diese geringe Expression des Proteins gp3 vom Phagen ist jedoch nicht auf eine ungewöhnliche Codonauswahl zurückzuführen. Ebenso spielt die Stärke des Phagenpromoters, von dem aus das Gen 3 transkribiert wird, keine Rolle, da das hochexprimierte Gen 5 vom selben Promotor gelesen wird.

Wahrscheinlich spielen regulatorische Sequenzen abwärts bzw. aufwärts vom Gen 3 oder auch Autoregulation eine Rolle bei der Expression des Proteins. Da das Protein gp3 an einen Bereich innerhalb seines eigenen Gens bindet, ist die Vorstellung einer Autoregulation sogar äußerst reizvoll.

Um das Genprodukt 3 getrennt vom Genprodukt 2 charakterisieren zu können und vor allem auch den Einfluß regulatorisch wirkender Phagensequenzen auszuschalten, schien es mir sinnvoll, das Gen 3 zu klonieren. Da das WT-Gen 3 kloniert vorlag, klonierte ich die Gene 3 der Phagenmutanten HT12/4 und NT1/1. Da das Genprodukt 3 in sehr geringer Menge gebildet wird, hielt ich es für notwendig, die Expression dieses Proteins durch Konstruktion eines geeigneten Vektors zu

steigern. Ich orientierte mich dabei an der Vorschrift von Guarente et al. (1980). Das ursprüngliche Ziel bestand darin, ein lac-Promoterfragment im optimalen Abstand vor das Startcodon des Gens 3 zu plazieren. Dadurch sollte die schwache Ribosomenbindungsstelle des Gens 3 durch die lacZ-spezifische SD-Sequenz auf dem lac-Promoterfragment ersetzt werden. Die β -Galaktosidaseaktivität der Gen 3-lacZ-Fusionsklone diene als Assaysystem für die Optimierung des Abstands. Mir gelang es allerdings nur, das lac-Promoterfragment in einem Abstand von 112 Bp vor das Startcodon von Gen 3 zu setzen. Die Expression des Proteins gp3 erfolgte dann konstitutiv vom lac-Promoter aus. Eine bessere Optimierung war mit Bal 31 nicht möglich. Wegen der vielen GC-Cluster im Gen 3 wäre es vermutlich sinnvoller gewesen, statt Bal 31 eine Kombination aus ExoIII/S1 bzw. ExoIII/ExoVII zu verwenden. Trotz des nur mittelmäßig optimierten Abstands konnte ich die β -Galaktosidaseaktivität der gp3- β -Galaktosidasefusionsklone um den Faktor 104 steigern. Die konstruierten Fusionsklone mit dem lacZ-Gen eigneten sich vortrefflich für eine Charakterisierung des Proteins HTgp3, da die exprimierten Fusionsproteine keinen funktionsfähigen gp3-Anteil besitzen. Die Mutante HT12/4 ist eine Mutante im Gen 3. Sie war für mich von Interesse, da sie die Verpackung der DNS nicht an der Wildtyp-pac-site startet, sondern andere Regionen auf dem Phagengenom bzw. Chromosom als pac-sites identifiziert (Jackson et al. 1982). Um festzustellen, ob eine Veränderung der pac-Stelle der Grund für das im Vergleich zum Wildtyp geänderte Verpackungsverhalten ist, untersuchte ich die Transduktion der Gen 3-lacZ-Fusionsklone durch den Phagen erfc2. Der Phage erfc2 bildet ein funktionsfähiges Genprodukt 3. Die Gen 3-lacZ-Fusionsklone wurden durch diesen Phagen gleich gut transduziert. Diese Transduktionsexperimente zeigten, daß das vom Phagen exprimierte Protein gp3 neben seiner eigenen pac-site auch die pac-Stellen der Mutanten HT12/4 und NT1/1 gut erkennt. Das bedeutet, daß das pac-Signal der Mutante HT12/4 nicht verändert sein kann. Untersucht man nun die Transduktion derselben Gen 3-lacZ-Fusionsklone durch den Phagen erf3HT, so kann man daraus ersehen, daß dieser Phage alle Hybridplasmide, ebenso das Vektorplasmid pMC1403 gleich gut transduziert. Das Vektorplasmid pMC1403 habe ich für eine Fusionierung des Gens 3 mit dem lacZ-Gen verwendet. Diese

Resultate zeigen, daß das vom Phagen erf3HT gebildete Genprodukt 3 der Mutante HT12/4 so verändert sein muß, daß es, da es die angebotenen pac-sites nicht erkennt, andere Sequenzen auf den Hybridplasmiden bzw. auf dem Kontrollplasmid pMC1403 als pac-site analog identifiziert. Interessanterweise unterscheidet sich das Protein gp3 der Mutante HT12/4 nur im Austausch der Aminosäure Glutaminsäure gegen Lysin vom Genprodukt 3 des Wildtyps.

Transduktionsexperimente erwiesen sich auch als exzellentes System, um Aussagen über eine Expression des Proteins gp3 von verschiedenen Hybridplasmiden (pGM1000, pGM1200, pGM1201) zu machen. Die rekombinierten Plasmide enthielten das HindIII/XhoI-Fragment von P22 und den Mutanten HT12/4 und NT1/1. Dieses DNS-Fragment trägt die genetische Information für das Gen 3. Das HindIII/XhoI-Fragment wurde in den HindIII/SalI-Bereich von pBR322 kloniert. In vielen Fällen führt eine Klonierung in die HindIII-Stelle von pBR322 zur Zerstörung des Tetracyclinpromoters. Da das Gen 3 keinen eigenen Promoter hat, kann das Genprodukt 3 nur dann exprimiert werden, wenn der Tetracyclinpromoter rekonstituiert worden ist. Um festzustellen, ob eine Expression des Proteins gp3 vom Tetracyclinpromoter aus erfolgt, führte ich eine Transduktion der Hybridplasmide pGM1000 (WT), pGM1200 (HT), pGM1201 mit dem Phagen erfam3 durch. Ich wählte den Phagen erfam3 für diese Transduktionsexperimente, da der Phage auf Grund der Ambermutation im Gen 3 kein funktionsfähiges Protein gp3 bilden kann. Die Experimente zeigten, daß die Plasmide pGM1000 und pGM1201 häufig, das Plasmid pGM1200 weniger häufig transduziert wird. Ohne biochemischen Nachweis kann man deshalb durch Transduktionen zeigen, daß das Protein gp3 vom Tetracyclinpromoter aus exprimiert wird. Die etwas geringere Transduktion des Plasmid pGM1200 kann man dadurch erklären, daß das exprimierte Protein HTgp3 keine Spezifität für sein eigenes pac-Signal besitzt und deshalb beliebige Regionen auf dem Plasmid als pac-sites akzeptiert. Sie bestätigen die Resultate der Transduktionen mit den Gen 3-lacZ-Fusionsklonen, daß das Protein HTgp3 im Vergleich zum Protein gp3 des Wildtyps verändert ist. Bei den neukonstruierten Plasmiden pGM1208, pGM1209, pGM1210 erfolgte eine konstitutive Expression des Genprodukts 3 vom lac-Promoter. Dieses Plasmide werden durch

den Phagen erfam3 sehr gut transduziert. Die T/P-Werte sind höher als die T/P-Werte, die man bei der Transduktion der Plasmide pGM1000 (WT), pGM1200 (HT), pGM1201 (NT) erhält. Diese Resultate bestätigen, daß unter der Kontrolle des lac-Promoters (pGM1208, pGM1209, pGM1210), im Vergleich zum Tetracyclin-promoter (pGM1000, pGM1200, pGM1201), eine größere Menge an Genprodukt 3 exprimiert wird. Daß das Hybridplasmid pGM1209, von dem das Protein HTgp3 gebildet wird, so häufig transduziert werden kann, war etwas verwunderlich. Aber anscheinend ist die Expression des jeweiligen Proteins der limitierende Faktor bei der Plasmidtransduktion. Trotz fehlender Spezifität für die Wildtyp-pac-site führt eine erhöhte Bildung des Proteins HTgp3 zu einer Verbesserung der Transduktionsrate. Durch Transduktionsexperimente versuchte ich auch zu untersuchen, ob es eine Veränderung in der Transduktionsrate chromosomaler Marker gibt, wenn das zur Verpackung notwendige Protein gp3 statt vom Phagen vom Hybridplasmid gebildet wird. Bei der Mutante HT12/4 erhält man eine generell häufige Transduktion chromosomaler Marker, unabhängig davon, ob das Protein HTgp3 vom Phagen oder vom Hybridplasmid bereitgestellt wird. Die Mutante NT1/1 hingegen zeichnet sich durch eine generell niedrige Transduktion chromosomaler Marker aus, wenn das Protein gp3 vom Phagen gebildet wird. Die niedrige Transduktion beruht auf einer Mutation, die außerhalb des Gens 3, zwischen Gen 3 und Gen 19 kartiert ist. Wird das Protein NTgp3 vom Hybridplasmid gebildet (pGM1201), so findet man eine ähnliche Transduktion wie bei der Expression des Proteins gp3 des Wildtyps (pGM1000). Die bakteriellen Marker HisB22 und Leu124 werden häufig, der Marker ProA2 wird gering transduziert. Diese Resultate bestätigen, daß der eigentliche Mutationsort der Mutante NT1/1 außerhalb des Gens 3 liegt.

Die zahlreichen Transduktionsexperimente, die ich durchgeführt habe, dienten zur biologischen Charakterisierung des Proteins gp3 des Wildtyps und der Mutanten HT12/4 und NT1/1. Neben der Untersuchung der biologischen Funktion dieses Proteins, war es Ziel dieser Arbeit, die Expression des Proteins gp3 biochemisch nachzuweisen und das Protein gp3 zu charakterisieren.

Das E. coli -Minizellsystem erwies sich als ausgezeichnetes System, um die Stärke der Expression des Proteins gp3 unter dem Tetracyclinpromoter mit der unter dem lac-Promoter zu

vergleichen.

Beim Vergleich der Proteinmuster der einzelnen Minizellaufarbeitungen konnte man eindeutig ein Protein nachweisen, das nicht vektorspezifisch war und auf Grund seines Molekulargewichts (17.800 D) dem Protein gp3 entsprach. Im Vergleich zu den Hybridplasmiden pGM1000, pGM1200, pGM1201 konnte man eine deutliche Steigerung der Expression des Proteins gp3 bei den neukonstruierten Plasmiden (pGM1208, pGM1209, pGM1210) unter dem lac-Promoter erkennen. Die Expression des NTgp3 konnte auf diese Weise um den Faktor 6,5 erhöht werden.

Auf Grund der Resultate mit den Minizellen war es sinnvoll, das Protein gp3 zu isolieren, um dadurch eine weitere Charakterisierung erreichen zu können. Bei der Isolierung des Genprodukts 3 aus einem Salmonella -Stamm mit dem rekombinierten Plasmid orientierte ich mich nicht an der Vorschrift von Poteete et al. 1979, sondern versuchte, geeignetere Reinigungsbedingungen zu finden.

Da es sich herausstellte, daß das Protein gp3 sehr empfindlich gegen Proteasen ist, war es erforderlich, jeden Reinigungsschritt in Gegenwart des Proteaseinhibitors PMSF durchzuführen. Proteaseinhibitor wurde weder von Poteete et al. 1979 noch von E. Koch bei der Proteinreinigung verwendet. Ein weiterer wesentlicher Schritt bei der Reinigung war die Entfernung der DNS aus dem Zellextrakt. Durch Vorversuche stellte ich fest, daß Streptomycinsulfat ein geeigneteres Reagenz für die DNS-Ausfällung als Polyethylenimin war. Außerdem war es notwendig, die Abtrennung der DNS mit Streptomycinsulfat in Gegenwart von 0,6 M NaCl durchzuführen. Für die Reinigung von Restriktionsendonukleasen wird im Vergleich dazu eine Salzkonzentration von nur 0,2 M NaCl empfohlen. Man kann dieses Resultat deshalb auch als indirekten Hinweis für eine hohe Affinität des Proteins gp3 zur DNS werten. Weder Poteete et al. 1979 noch E. Koch fügten diesen Schritt in ihre Reinigung ein.

Für mich war eine möglichst optimale Abtrennung der DNS wichtig, um eine spezifische Bindung an die 1. Säule zu bekommen. Heparin Sepharose CL 6B erwies sich als geeignetes Material für die erste Säulenchromatographie. Heparin ist ein Mucopolysaccharid, das die DNS imitiert. Es zeigte sich, daß

das Genprodukt 3 eine hohe Affinität zu Heparin besitzt. Eine Salzkonzentration von 0,67 M NaCl war für die Elution dieses Proteins notwendig. Als zweiter Chromatographieschritt wurde entweder eine weitere Affinitätschromatographie mit DNS-Cellulose oder eine Gelfiltration mit Sephadex G75 angeschlossen. DNS-Cellulose enthält 0,25 -1,5 mg Kalbsthymus-DNS /ml Gel. Daß das Protein gp3 eine relativ hohe Affinität zu Heparin, jedoch keinerlei Affinität zu DNS-Cellulose hatte, erwies sich zwar für meine Reinigung als Vorteil, war jedoch sehr Überraschend. In den Experimenten, die im Verlauf meiner Arbeit durchgeführt wurden, konnte ich immer die Spezifität des Proteins gp3 zur pac-site zeigen. Die Transduktionen von verschiedenen rekombinierten Plasmiden und chromosomalen Markern können als Beweis für die Spezifität des Proteins für die pac-site und für pac-analoge Stellen auf dem Chromosom gelten. Das Plasmid pBR322 wird nicht nachweisbar transduziert, da es kein pac-Signal trägt. Daß das Protein gp3 keine Affinität für Kalbsthymus-DNS hat, ist unerklärlich, da man erwarten sollte, daß auch auf eukaryotischer DNS pac-analoge Sequenzen zu finden sein sollten. Eine Interpretationsmöglichkeit für die hohe Affinität zu Heparin wäre, daß Heparin auf Grund seiner Ladungen eine pac-ähnliche Struktur imitiert.

Im Verlauf der Reinigung zeigte es sich, daß das Protein gp3 eine hohe Tendenz zur Aggregation mit sich selbst (Homooligomer) oder mit zellulären Komponenten (Heterooligomer) besitzt. Durch Gelfiltration mit Sephadex G50 bzw. G75 und durch Affinitätschromatographie mit Heparin kann man die Aggregation nachweisen. Tween 80 erwies sich in einer Konzentration von 0,01% bis 0,02% als geeignetes Reagenz, um die Aggregation ohne Verlust in der Aktivität des Proteins gp3 aufzuheben. Führt man die Affinitätschromatographie mit Heparin ohne Tween 80 durch, so kann man zwei Aktivitätspeaks erkennen. Die Aggregatform des Proteins gp3 besitzt eine geringere Affinität zu Heparin und wird bereits bei 0,42 M NaCl eluiert. Die monomere Form wird erst bei 0,67 M eluiert. In Gegenwart von 0,01% Tween 80 erhält man bei der Chromatographie mit Heparin nur einen Aktivitätspeak. Die Elution erfolgt bei 0,67 M NaCl.

Neben der Tendenz zur Aggregation erwies sich auch die je nach

Reinigungsstufe unterschiedliche Stabilität des Proteins gp3 als problematisch. Durch Vorversuche stellte ich fest, daß Magnesium die Aktivität des Proteins gp3 um den Faktor 2,7 steigern kann. Mit Hilfe von Magnesium war es auch möglich, die gp3-Aktivität der Heparinpeakfraktion zu stabilisieren. Verschiedene andere Ionen hatten, ebenso wie BSA oder Gelatine, keinen stabilisierenden Einfluß auf die gp3-Aktivität. Die Aktivität der Peakfraktion der DNS-Cellulose-Säule kann ebenfalls durch Magnesium konstant gehalten werden. Der starke Aktivitätsabfall nach der Gelfiltration mit Sephadex G75 kann hingegen weder durch Magnesium noch durch BSA bzw. Gelatine abgefangen werden. Da bei der Gelfiltration die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden, kann man den Aktivitätsabfall vielleicht mit dem Entfernen eines Kofaktors, der ein Protein darstellt, erklären.

Das Protein gp2 ist das einzige Protein, von dem eine Komplexbildung mit dem Protein gp3 bekannt ist. Bei der Herstellung des Rohextrakts wurde der Salmonella -Stamm mit einem 2am Phagen infiziert. Deshalb kann man den Aktivitätsverlust des Proteins gp3 entweder mit dem Entfernen eines unbekannten Proteins oder mit dem Wegreinigen des 2am-Proteinfragments erklären. Ob ein 2am-Proteinfragment in der Lage ist, eine Komplexbildung mit dem Protein gp3 durchzuführen, ist jedoch fraglich.

Um die pac-site zu identifizieren und somit eine direkte Bindung des Proteins gp3 an den pac-Bereich nachzuweisen, setzte ich 25 μ l einer hochaktiven Heparinpeakfraktion in einen Gel-Retardierungsassay ein (Daten nicht gezeigt). In meinem Assayansatz prüfte ich die Bindung des Proteins gp3 an ein MstII/Sau3A-Fragment (350 Bp), das den pac-Bereich enthält. Um die unspezifischen Proteine wegzufangen, kompetitierte ich mit Kalbsthymus-DNS.

Mir gelang es jedoch nicht, auf diese Weise, eine direkte Bindung des Proteins gp3 an das pac-enthaltende DNS-Fragment nachzuweisen. Grund für das Mißlingen des Experiments ist vielleicht das Fehlen des vermuteten Kofaktors, z.B. des Proteins gp2 oder einer anderen Zellkomponente. Ob ein Komplex aus den Proteinen gp2 und gp3 für eine Bindung an die pac-site notwendig ist, könnte man prüfen, indem man eine beide Proteine enthaltende Säulenfraktion in den Testansatz einsetzt.

E. Literaturverzeichnis

- Adler H. , Fisher W. D. , Cohen A. , Hardigree A. A (1967) Miniature E. coli cells deficient in DNA. PNAS 57: 321-326
- Amann E. , Brosius J. , Ptashne M. (1983) Vectors bearing a hybrid trp-lac promoter useful for regulated expression of clones genes in E. coli. Gene 25: 167-178
- Atkinson A., Jack G. W. (1973) Precipitation of nucleic acids with Polyethylenimine and the chromatography of nucleic acids and proteins on immobilised Polyethylenimine. Biochemica et Biophysica Acta 308: 41-52
- Backhaus H, Petri B. (1984) Sequence analysis of a region from the early right operon in phage P22 including the replication genes 18 und 12. Gene 32: 289-303
- Backhaus H. (1985) DNA packaging initiation of Salmonella bacteriophage P22: Determination of cut sites within the DNA sequence coding for gene 3. J. of Virol. 55: 458-465
- Bajaj S. P. , Rapaport S. I. , Prodanos C. (1981) A simplified procedure for purification of human prothrombin factor IX and factor X. Prep. Biochem. 11: 397-412
- Becker A. , Gold M. (1978) Enzymatic breakage of cohesive end site of phage DNA: Terminase (ter)reaction. Proc. Natl. Sci. USA 75: 4199-4203
- Behnisch W. and Schmiegler H. (1985) In vitro packaging of plasmid DNA oligomers by Salmonella phage P22:Independence of the pac site and evidence for the termination cut in vitro. Virol. 144: 310-317
- Bickle T.A. , Pirodda V. , Imber R. (1977) A simple general procedure for purifying restriction endonucleases. Nucl. Acids Res. 4: 2561-2572

Birnboim H. C. , Doly (1979) Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7: 1513-1523

Botstein D. , Carol H. , Wadell C.H. ,King J. (1973) Mechanism of head assembly and DNA encapsulation in Salmonella phage P22. I. Genes, proteines, structures and DNA maturation. *J. Mol. Biol.* 80: 669-695

Bradford M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* 72: 248-254

Campell A. , Botstein D. (1983) Evolution of lamdoid phages. *Lambda II* (ed. by Hendrix et al.) Cold spring Harbor N.Y. , 365-380

Casadaban M. J. , Chou J. , Cohen S. N. (1980) in vitro gene fusions that join an enzymatically active B-galactosidase segment to amino-terminal fragments of exogenous proteins: Escherichia coli plasmid vectors for the detection and cloning of translational initiation signals. *J. of Bacteriol.* 143: 971-980

Casadaban M. J. , Martinez A. A. , Shapira S. K. and Chou J. (1983) B- Galactosidase gene fusions for analyzing gene expression in Escherichia coli and yeast. *Methods in Enzym.* 100: 293-300

Casjens S. ,King J. (1974) P22 Morphogenesis I: Catalytic scaffolding protein in capsid assembly. *J. of Supramolecular structure* 2: 202-224

Casjens S. , Huang W. H. (1982) Initiation of sequential packaging of bacteriophage P22 DNA. *J. Mol. Biol.* 157: 287-298

Casjens S. , Adams M. , Hall C. , King J. (1985) Assembly controlled autogenous modulation of the bacteriophage P22 scaffolding protein gene. J. Virol. 53: 174-179

Dagert M. , Ehrlich S.D. (1979) Prolonged incubation in calcium chlorid improves the competence of E. coli cells. Gene 6: 23-28

Earnshaw W. C. , Casjens S. R. (1980) DNA Packaging by the double stranded DNA bacteriophages. Cell 21: 319-331

Faraoqui A. A. (1980) Purification of enzymes by heparin sepharose affinity chromatography. J. Chrom. 184: 473-484

Feiss M. (1986) Terminase and the recognition, cutting and packaging of chromosomes. TIG 2: 100-104

Feiss M. , Fisher R. A. , Crayton M. A. , Egner C. (1977) Packaging of the bacteriophage chromosom: effect of chromosom length. Virol. 77: 281-293

Feiss M. and Siegele D. A. (1979) Packaging of the bacteriophage Lambda chromosom: dependence of cos cleavage on chromosome length. Virol. 92: 190-200

Garoff H. , Ansorge W. (1981) Improvement of DNA sequencing gels. Anal. Biochem. 115: 450-457

Gilbert M. , Dressler D. (1968) DNA replication: The rolling circle model. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 33: 473-484

Görg A. , Postel W. , Weser J. (1985).Horizontale SDS-Elektrophorese in ultradünnen Gradientengelen zur Differenzierung von Urinproteinen. Eine hochauflösende empfindliche und schnelle Methode für die Routineanalyse. LKB Workshop MPI München.

Guarente L. , Lauer G. Roberts T. M. , Ptashne M. (1980) Improved methods for maximizing expression of a cloned gene:A bacterium that synthesizes rabbit β -globin. Cell 20: 543-553

- James G. T. (1978) Inactivation of the protease inhibitor Phenylmethylsulfonylfluorid in buffers. Anal. Biochem. 86: 574-579
- Jackson E. N. , Laski F., Andres C. (1982) Bacteriophage P22 mutants that alter the specificity of DNA packaging. J. Mol. Biol. 154: 551-563.
- Kufer B. , Backhaus H. (1982) , Schmieger H. (1982) The packaging initiation site of phage P22. Analysis of packaging events by transduction. Mol. Gen. Genet. 187: 510-515
- Lämml U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.
- Landick R. (1982) Strategies for cloning using Bal 31 Nuclease. Focus 4: 1-5
- Levy S. B. , Norman P. (1970) Segregation of transferable R factors into E. coli minicells. Nature 227: 606-607
- Levy S. B. (1971) Physical and functional characteristics of R factor deoxyribonucleic acid segregated into E. coli minicells. J. of. Bact. 108: 300-308
- Levy S. B. (1975) Very stable procaryotic messenger RNA in chromosomelles E. coli minicells. PNAS 72: 2900-2904
- Loomann A. C. , de Gruyter M. , Vogelaar A. , van Knippenberg P. H. (1985) Effects of heterologous ribosomal binding sites on the transcription and translation of the lacZ gene of E. coli . Gene 37: 145-154
- Maxam A. ,Gilbert W. (1980) Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavage. Meth. in Enzym. 65: 499-559

Merill C. R. , Goldman D. , Ebert M. L. , Sedman S. A. (1981) Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamidgels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins. Science 211: 1437-1438

Miller (1972) Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory New York

Murialdo H. , Becker A. (1978) Head morphogenesis of complex double-stranded deoxyribonucleic acid bacteriophages. Microbiol. Reviews 42: 529-576

Orbach M.J., Jackson E. (1982) Transfer of chimeric plasmids among Salmonella typhimurium strains by P22 transduction. J. Bacteriol. 149: 985-994

Poteete A. R. , Botstein D. (1979) Purification and properties of protein essential to DNA encapsulation by phage P22 . Virol. 95: 565-573

Petri J. B. , Backhaus H. (1984) Strukturelle organization of the ori site phage P22: Comparison with other lambdoid ori sites. Gene 32: 304-310

Pirotta V. , Bickle T. A. (1980) General purification schemes for restriction endonucleases. Methods of Enzymol. 65: 89-95

Raj A.S. , Raj A. Y. ,Schmieger H. (1974) Phage genes involved in the formation of generalized transducing particles in Salmonella phage P22

Remaut E, Stanssens P, Fiers W. (1981) Plasmid vectors for high efficiency expression controlled by the pL promoter of Coliphage Lambda. Gene 15: 81-93

Rhoades M. , Mac Hattie L.A. , Thomas C.A. (1968) The bacteriophage DNA molecule I .The mature form. J. Mol. Biol. 37: 21-40

Rutila J.E., Jackson E.N. (1981) Physical map of the bacteriophage P22 genome. *Virology* 113: 769-775

Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. (1977) DNA Sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74: 5463-5467

Sanger F., Coulson A.R., Barrell B. G., Smith A.J.H., Roe B.A. (1980) Cloning in single-stranded bacteriophage as an aid to rapid DNA sequencing. *J. Mol. Biol.* 143: 161-178

Sauer R.T., Yocum R.R., Doolittle R.F., Levis M., C.O. Pabo (1982) Homology among DNA-binding proteins suggests use of a conserved super secondary structure. *Nature* 238: 447-451

Schmidt C., Schmiegler H. (1984) Selective transduction of recombinant plasmids with cloned pac-sites by Salmonella phage P22. *Molec. gen. Genet.* 196: 123-128

Schmiegler (1971) A method for detection of phage mutants with altered transducing ability. *Molec. gen. Genet.* 110: 238-244

Schmiegler (1972) Phage P22 mutants with increased or decreased transduction abilities. *Molec. gen. Genet.* 119: 75-88

Schmiegler H., Backhaus H. (1976) Altered cotransduction frequencies exhibited by HT-mutants of Salmonella Phage P22. *Molec. gen. Genet.* 143: 307-309

Schmiegler H. (1984) Pac sites are indispensable for in vivo packaging of DNA by phage P22. *Mol. Gen. Genet.* 195: 252-255

Schmiegler H., Koch E. (1987, im Druck) In vitro assay of packaging protein gp3 of Salmonella phage P22

Schumann W., Bade E.G. (1977) A *Salmonella typhimurium* endonuclease that converts native DNA to fragments of about 8×10^5 . *J. gen. Microbiol.* 101: 319-325

Shapira S.K., Chou J., Richaud F.V., Casadaban M.J. (1983) New versatile plasmid vectors for expression of hybrid proteins codes by a cloned gene fused to lacZ gene sequences encoding an enzymatically active carboxy-terminal portion of B-Galactosidase . Gene 25: 71-82

Shine J., Dalgarno L. (1974) The 3' terminal sequence of Escherichia coli 16s ribosomal RNA: complementarity to nonsense tripletts and ribosome binding sites. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 2741-2745

Strauch M.A., Baumann M., Friedman D.I., Baron L.S. (1986) Identification and characterization of mutations in E. coli that selctiveley influence the growth of hybrid bacteriophages carrying the immunity region of bacteriophage P22. J. of. Bact. 167: 191-200

Streisinger G., Einrich J., Stahl M. (1967) Chromosome structure in phage T4. Terminal redundancy and length determination. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 57: 292-295

Strobel E., Schmieger H. (1979) In vitro packaging of exogenous DNA by Salmonella phage P22. J. gen. Virol. 45: 291-293

Susskind M.M., Botstein D. (1978) Molecular genetics of bacteriophage P22 Microbiol. Rev. 42: 385-413

Switzer R.C., Merril C.R., Shifrin S. (1979) A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. Analyt. Biochem. 98: 231-237

Tye B.K., Hubermann J.A., Botstein D. (1974a) Non-random circular permutation of phage P22 DNA. J. Mol. Biol. 85: 501-527

Tye B.K., Chan R.K., Botstein D. (1974b) Packaging of an oversize transducing genome by Salmonella phage P22. J. Mol. Biol. 85: 485-500

Yoderian P., Susskind M. (1980) Identification of the products of bacteriophage P22 genes , including a new late gene . Virology 107: 258-269

Warm E., Hofman H. (1985) Vertikale zweidimensionale Elektrophorese von hochkomplexen Proteingemischen und Translationsprodukten. LKB Workshop MPI München

Weinstock G.M., Berman M.L., Silhavy T.J. (1983) Chimeric genetics with β -Galactosidase. Cold Spring Harbor Laboratory.

Zabeau M., Stanley K.K. (1982) Enhanced expression of cro- β -Galactosidase fusion proteins under the control of the pR promoter of bacteriophage. EMBO J. 1: 1217-1224

Zinder N.D., Lederberg J. (1952) Genetic exchange in Salmonella . J. Bacteriol. 64: 679-699

LEBENS LAUF

Name: Sigrid Schießl
Geburtsdatum: 16.07.1958
Geburtsort: Nabburg

Schulische Ausbildung:

1964-1968: Besuch der Volksschule in Nabburg
1968: Eintritt in das humanistische
Gymnasium in Nabburg
1977 Abitur

Berufliche Ausbildung:

WS 1977/78: Immatrikulation für Biologie an der
Universität Regensburg
Okt. 1979 Vordiplomprüfung
Nov. 1981 Diplomprüfung in den Fächern Mikro-
biologie, Biochemie, Zoologie,
Organische Chemie an der Universität
Regensburg
Feb. 1982-Jan. 1983 Diplomarbeit unter Anleitung von Herrn
Prof. Dr. W. Goebel am Institut für
Mikrobiologie der Universität
Würzburg
seit Mai 1983 Doktorarbeit unter Anleitung von Herrn
Prof. Dr. H. Schmieger am Institut für
Genetik der Universität München

Druck:
UNIKOPIE
Adalbertstr. 18
8000 München 40
Tel.: 33 33 63

